

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Infection naturelle au virus de Schmallenberg dans l'espèce ovine de l'image individuelle à la résonance collective

CLAINE, Francois

Award date:
2023

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Université de Namur – Faculté des Sciences

Département de Médecine Vétérinaire

Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS)

Infection naturelle au virus de Schmallenberg dans l'espèce ovine : de l'image individuelle à la résonance collective

François CLAINE



Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Vétérinaires

Année académique 2022-2023

Faire de chacun de nos rêves une rêv'olution...

Résumé

Au mois de novembre de l'année 2011, le Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) démontrait l'association d'un syndrome fébrile observé auprès de bovins laitiers en Allemagne à l'infection par un nouvel agent pathogène à transmission vectorielle dénommé « virus de Schmallerberg » ou SBV. Dans les semaines et mois qui suivirent cette primo-identification, une épidémie de malformations congénitales, caractérisées par un syndrome dit « arthrogrypose-hydranencéphalie », était observée chez les agneaux nouveau-nés, les chevreaux et les veaux dans le nord-ouest de l'Europe, avant de poursuivre sa dispersion sur l'ensemble du continent.

A l'instar de nombreux autres élevages de ruminants présents sur le territoire national, le Centre de Recherches Ovines (CRO) de l'Université de Namur a vu poindre les premières manifestations cliniques de l'infection transplacentaire au SBV durant la campagne d'agnelages du mois de janvier 2012.

Cette thèse se veut le récit fidèle des épisodes successifs de circulation virale et de latence connus par le troupeau du CRO, articulé autour des données anatomo-pathologiques, virologiques et sérologiques collectées tant à titre individuel qu'à hauteur de collectivité. De l'aube de l'année 2012 au crépuscule de l'année 2016, les cinq années de suivi opéré ont ainsi permis de mieux appréhender l'impact de l'infection naturelle du SBV dans l'espèce ovine.

Les investigations menées durant la période dite d'émergence virale ont principalement assuré la description anatomo-pathologique et histo-pathologique des lésions associées à l'infection transplacentaire, l'évaluation de la séroprévalence intra-troupeau et de l'impact du SBV sur les paramètres de reproduction. En outre, une analyse sérologique rétrospective a permis de dater le temps d'émergence virale au sein du troupeau.

A l'issue de cette période de circulation virale, la mise en place et le suivi d'une population ovine qualifiée de sentinelle ont offert la possibilité de mettre en évidence une phase dite de réexpression dont les traductions lésionnelles et sérologiques ont pu être appréciées. La durée de l'immunité colostrale chez l'agneau né de mère infectée ainsi que celle de l'immunité active chez l'ovin adulte ont été également déterminées.

Enfin, de la période de latence qui s'ensuit et de la surveillance sérologique inhérente à sa définition, un modèle mathématique prédictif de résurgence virale a été établi puis validé en épreuves virologique et sérologique courant l'année 2016.

Ecart de quelques années entre investigations et rédaction faisant, cette thèse a pris le recul nécessaire pour discuter des intérêts et limites des méthodes déployées dans le cadre de la description des vagues épidémiques successives, de l'évaluation de leur impact sur le troupeau ovin du CRO et de leur résonance sectorielle. En outre, cette thèse, parce qu'elle s'intéresse à un secteur d'élevage certes en croissance mais au demeurant méconnu, souhaite attirer l'attention sur l'importante marge de progression dans la communication aux éleveurs au sujet de la maîtrise de la biosécurité et celle de la santé des troupeaux de petits ruminants comme de leur participation aux initiatives fédérales visant à tenter de préciser l'origine infectieuse des phénomènes abortifs.

Abstract

In November 2011, the Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) demonstrated the association of a febrile syndrome observed in dairy cattle in Germany with infection by a novel vector-borne pathogen called "Schmallenberg virus" or SBV. In the weeks and months following this initial identification, an epidemic of congenital malformations, characterized by an « arthrogryposis-hydranencephaly » syndrome, was observed in newborn lambs, kids, and calves in northwestern Europe, before spreading throughout the continent.

Like many other ruminant farms spread on the Belgian territory, the first clinical manifestations of transplacental SBV infection were observed during the lambing season of January 2012 in the Ovine Research Center (ORC) of the University of Namur.

This dissertation is a faithful account of the successive episodes of viral circulation and latency experienced by the ORC flock, composed by the anatomo-pathological, virological and serological data collected both individually and collectively. From early 2012 to late 2016, five years of monitoring have thus allowed a better understanding of the impact of the natural infection of SBV in sheep flocks.

The investigations carried out during the period of viral emergence have mainly ensured the anatomo-pathological and histo-pathological description of lesions associated with transplacental infection, the evaluation of within-herd seroprevalence and the impact of SBV on reproductive parameters. In addition, a retrospective serological analysis allowed to date the time of viral emergence in the ORC.

At the end of this period of viral circulation, the monitoring of a sentinel sheep population offered the possibility of highlighting a re-expression phase whose lesional and serological consequences could be assessed. The duration of colostral immunity in lambs born from infected ewes and the duration of active immunity in adult sheep were also determined.

Finally, a predictive mathematical model of viral resurgence was established and validated through virological and serological tests during 2016.

This dissertation also focuses on the interests and limits of the methods deployed in the context of the description of the successive epidemic waves, the evaluation of their impact on the ORC sheep flock and on the sheep sector. In addition, this dissertation, because it focuses

on a livestock sector that is certainly growing but is not well known, wishes to draw attention to the important step for improvement in communicating to farmers about the control of biosecurity and the health of small ruminant flocks, as well as their participation in federal initiatives aimed to determine the infectious origin of abortive phenomena.

Remerciements

Aux « inspirants » qui ont jalonné ce parcours doctoral de leurs balises avec pertinence, rigueur et bienveillance...

Je pense tout particulièrement au Prof. Nathalie Kirschvink, mon promoteur de thèse, qui m'a permis d'évoluer sereinement au fil d'un parcours quelque peu atypique, jalonnant celui-ci de ses précieux conseils et œuvrant tel un guide dans des versants parfois escarpés. J'ai grandi à tes côtés dans l'apprentissage de l'effcience et de la ténacité éclairée.

Mes pensées vont également au Prof. Benoît Muylkens, mon co-promoteur, qui m'a dévoilé les richesses d'une science qui se veut infinie tant les réponses d'un jour se muent en questions le lendemain.

Aux Prof. Martin Beer du Friedrich-Loeffler-Institut, Jean-Jacques Letesson et Charles Nicaise de l'Université de Namur et Claude Saegerman de l'Université de Liège pour leur contribution à ces travaux.

Aux « épaulants » qui ont rendu possible cette aventure par leur détermination et leur engagement sans faille...

Au sein de l'Unité de Recherche Vétérinaire Intégrée, mes remerciements s'adressent en premier à Laetitia Wiggers, notre maître d'orchestre. Laetitia, tes accompagnements ont permis à cette symphonie de sonner juste et je te remercie pour ton indéfectible soutien. Je pense aussi à Damien Coupeau qui, de par son expérience et ses qualités de métronome, a contribué à l'écriture de cette partition.

A Isabelle Gennart, Daniel Van Vlaender, Yves de Raeve, Robert Graffin, Fanny Hontoir, Vincent Simon, Jean-Michel Vandeweerd et Claire Diederich, mes anciens collègues namurois.

Des « épaulants », il y en eut également à quelques kilomètres de Namur, au cœur de la vallée du Samson. Tant d'heures, de jours et de nuits passées au sein du Centre de Recherches Ovines de Faulx-Les-Tombes entouré d'une inoubliable équipe. Benoît, Christine, Nicolas, Marianne, c'est avec une infinie gratitude et empli d'émotion que je vous dédie ces quelques lignes. Vous savez combien j'ai apprécié évoluer avec vous.

Aux « entourants » qui ont maintenu indéfectiblement dans les coulisses un seuil d'encouragement plusieurs années durant...

Merci à mes parents, à toi Pauline, à vous Anna, Léona et Hippolyte. Merci pour votre soutien, vos sourires, vos gestes et vos regards bienveillants. Qu'il est bon de se savoir entouré de vous, d'une famille « où naît la vie et où l'amour se ne tarit jamais » ...

Je ne peux refermer ces remerciements sans avoir une pensée...

... pour les nombreux doctorants, mémorants, stagiaires et techniciens qui ont contribué à l'évolution des ces recherches durant ces années de parcours doctoral ;

... pour mes collègues actuels de l'ARSIA, ma « team » cinacienne ;

... pour tous celles et ceux croisés quotidiennement au gré de mes tournées de visite qui nourrissent de leur témoignage mes réflexions et mes rêv'olutions.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Remerciements	v
Table des matières	vii
Liste des abréviations	xi
Liste des tableaux	xii
Liste des figures	xiii
Liste des annexes	xv
INTRODUCTION	1
A. Le virus de Schmallerberg : état des lieux	3
<i>A.1 Distribution temporelle et géographique du virus en Europe</i>	3
<i>A.2 Eléments de virologie moléculaire</i>	6
a) Structure et génome	7
b) Cycle viral	8
c) Virémie	9
<i>A.3 Transmission du virus et espèces sensibles</i>	9
a) Transmission vectorielle	9
b) Transmission transplacentaire et vénérienne	11
c) Espèces sensibles	12
<i>A.4 Manifestations cliniques de l'infection au SBV</i>	14
<i>A.5 Eléments de pathogénie virale</i>	17
<i>A.6 Outils diagnostiques</i>	18
<i>A.7 Mesures de suivi, de prévention et de contrôle</i>	21
<i>A.8 Impacts sur la santé et la productivité des troupeaux</i>	23

B. Typologie du secteur ovin en Belgique	25
C. Considérations à propos de l'état et du suivi sanitaires des troupeaux ovins	27
D. Objectifs du travail	29
CHAPITRE I : Matériel & Méthodes	30
A. Matériel	30
<i>A.1 Généralités</i>	30
<i>A.2 Eléments de régie de troupeau en peripartum</i>	31
<i>A.3 Population suivie</i>	32
B. Méthodes	32
<i>B.1 Prélèvements biologiques</i>	32
a) Sang	32
b) Colostrum	32
<i>B.2 Test de neutralisation virale (VNT)</i>	33
a) Culture cellulaire	33
b) Isolat viral	33
c) Dilution des sera et expression des résultats	33
<i>B.3 Réaction en chaîne quantitative par polymérase en temps réel (RT-qPCR)</i>	33
<i>B.4 Projets éthiques</i>	34
CHAPITRE II : Episode premier ou phase d'émergence virale	35
A. Approche descriptive des manifestations lésionnelles rencontrées	37
<i>A.1 Considérations anatomo-pathologiques</i>	38
<i>A.2 Considérations histo-pathologiques</i>	42
B. Association des observations cliniques à l'infection transplacentaire au SBV	44
<i>B.1 Approche virologique</i>	44
<i>B.2 Approche sérologique</i>	45
C. Evaluation de la séroprévalence intra-troupeau	46

D. Détermination rétrospective de la période d'émergence virale	47
E. Impact de l'émergence du SBV sur les paramètres de reproduction	49
F. Intérêts et limites des méthodes déployées	51
G. Discussion	54
CHAPITRE III : Episode deuxième ou phase de réexpression virale	60
A. Mise en évidence de la phase de réexpression virale	63
B. Conséquences de l'épisode de réexpression sur l'immunité du troupeau	67
<i>B.1 Etat de production des lots au moment de la phase de réexpression</i>	<i>67</i>
<i>B.2 Manifestations lésionnelles observées</i>	<i>68</i>
<i>B.3 Evaluation de la séroprévalence intra-troupeau</i>	<i>69</i>
<i>B.4 Durée de l'immunité colostrale</i>	<i>70</i>
C. Intérêts et limites des méthodes déployées	74
D. Discussion	76
CHAPITRE IV : Episode troisième ou phase de latence	80
A. Surveillance sérologique d'une nouvelle vague de circulation virale	83
B. Evaluation du maintien de l'immunité active	84
C. Développement d'un modèle prédictif de la réémergence virale	85
D. Modélisation de l'évolution de la séroprévalence intra-troupeau	86
E. Intérêts et limites des méthodes déployées	90
F. Discussion	93
CHAPITRE V : Episode quatrième ou nouvelle phase de circulation virale	96
A. Mise en évidence d'un nouvel épisode de circulation virale	98
B. Validation du modèle prédictif établi	99

C. Discussion	100
DISCUSSION GENERALE	102
A. Culicoïdes : le chaînon manquant	103
B. SBV et BTV : un parallélisme évident	105
C. SBV, une histoire qui s'écrit au présent ?	108
CONCLUSION & PERSPECTIVES	110
Références bibliographiques	114
Annexes	125

Liste des abréviations

AFSCA	Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire
AINO	Virus AINO
AKAV	Virus AKABANE
AMC	Arthrogryposis Multiplex Congenita
ARN	Acide ribonucléique
ARSIA	Association Régionale de Santé et d'Identification Animales
BHK	Baby Hamster Kidney
BTV	Virus de la langue bleue
BTV-8	Virus de la langue bleue (sérototype 8)
CRO	Centre de Recherches Ovines
Ct	Cycles de thermocycleur
ED50	Dose Efficace 50
EFSA	European Food Security Agency
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FBS	Fœtal Bovine Serum
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
FMV	Faculté de Médecine Vétérinaire
GMEM	Glasgow Minimum Essential Medium
HE	Hémalun Erythrosine
HES	Hémalun Erythrosine Safran
KC	<i>Culicoides variipennis</i> Cell line
LNR	Laboratoire National de Référence
Log ₂ ED ₅₀	Logarithme en base 2 de la Dose Efficace 50
MEM	Minimum Essential Medium
PCR	Polymerase Chain Reaction
R ₀	Taux reproductif de base
Re	Taux reproductif effectif
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription Polymerase Chain Reaction
RW	Région Wallonne
SATV	Virus Shatuperi
SBV	Virus de Schmallerberg
SHAV	Virus Shamonda
SNC	Système Nerveux Central
Syndrôme AG-HE	Syndrôme Arthrogrypose-Hydranencéphalie
TCID ₅₀	Total Count Infectious Dosis 50
ULiège	Université de Liège
UNamur	Université de Namur
VNT	Virus Neutralisation Test

Liste des tableaux

Tableau 1 <i>p.4</i>	Pays du continent européen ayant rapporté des cas d'infection par le SBV dans les troupeaux bovins et/ou ovins et/ou caprins, ou ayant détecté des anticorps anti-SBV dans le sérum ou le lait entre le 2 ^{ème} semestre de l'année 2011 et le 2 ^{ème} semestre de l'année 2014
Tableau 2 <i>p.13</i>	Espèces de mammifères sensibles au SBV et voies d'identification de l'infection virale : signes cliniques chez l'animal adulte (A) et/ou le nouveau-né (N), diagnostic direct (génomme viral) par RT-PCR et diagnostic indirect (anticorps anti-SBV) par VNT ou ELISA
Tableau 3 <i>p.40</i>	Comparaison des ratio « largeur épiphysaire/longueur diaphysaire » évalués auprès des agneaux SBV et des agneaux « Contrôle » dans le cadre de l'étude ostéométrique
Tableau 4 <i>p.42</i>	Caractéristiques cliniques et lésionnelles des différents profils d'agneaux SBV nés courant la période d'agnelages de janvier 2012 (n=28)
Tableau 5 <i>p.44</i>	Résultats des tests RT-qPCR opérés sur des biopsies de SNC auprès des 28 agneaux SBV nés au cours de la période d'agnelages de janvier 2012. Ces résultats sont exprimés en valeur de Ct avec un seuil de positivité inférieur à 40,0.
Tableau 6 <i>p.45</i>	Valeurs de dilution médianes (min-max) menant à la neutralisation virale (VNT) associées au % d'individus séropositifs et concentrations sériques en IgG (µg/ml) obtenues par ELISA
Tableau 7 <i>p.50</i>	Taux de prolificité évalués pour les campagnes d'agnelages des mois de janvier, mars et mai 2012 et taux de prolificité évalués pour des campagnes antérieures à mêmes périodes
Tableau 8 <i>p.66</i>	Circulation du SBV au sein du groupe d'agnelles sentinelles (n=50) objectivée par diagnostic direct (RT-qPCR) et diagnostic indirect (VNT). Les résultats positifs cumulés (Ct<40 et log ₂ ED ₅₀ > 3,49) obtenus entre juillet et octobre 2012 sont exprimés en nombre et en pourcentage.
Tableau 9 <i>p.69</i>	Malformations congénitales et valeurs de Ct issues de la RT-qPCR opérée sur biopsies de tissus nerveux centraux prélevés auprès d'avortons et d'agneaux mort-nés suspects d'infection transplacentaire au SBV et produits suite à la période de réexpression virale
Tableau 10 <i>p.89</i>	Concordance des statuts sérologiques SBV estimés sur base du modèle mathématique déployé et évalués par VNT des ovins présents au CRO durant le mois de décembre 2015

Liste des figures

Figure 1 <i>p.5</i>	Pays du continent européen ayant rapporté des cas d'infection par le SBV dans les troupeaux bovins et/ou ovins et/ou caprins, ou ayant détecté des anticorps anti-SBV dans le sérum ou le lait entre le 2 ^{ème} semestre de l'année 2011 et le 2 ^{ème} semestre de l'année 2014
Figure 2 <i>p.8</i>	Représentation du SBV et de l'organisation de son génome
Figure 3 <i>p.16</i>	Infection au SBV chez l'agneau nouveau-né présentant de l'arthrogrypose, de la scoliose et un torticolis (A), une brachygnathie inférieure (B) et une hypoplasie cérébrale/cérébelleuse (C)
Figure 4 <i>p.20</i>	Diagnostic de l'infection par le SBV sur base de l'observation des signes cliniques (ovins adultes) ou des lésions (avortons, mort-nés et nouveau-nés) complétée par les principales démarches proposées par les laboratoires en termes d'approche indirecte (ELISA et VNT) ou directe (RT-PCR)
Figure 5 <i>p.26</i>	Evolution du nombre de troupeaux ovins recensés sur le territoire de la Région Wallonne entre l'année 2017 et l'année 2021
Figure 6 <i>p.27</i>	Répartition des troupeaux ovins wallons par catégorie de taille selon le nombre d'individus femelles déclarés en 2021
Figure 7 <i>p.37</i>	Description synthétique de la méthodologie déployée dans le cadre de l'approche descriptive des manifestations lésionnelles rencontrées suite à l'émergence du SBV dans le troupeau du CRO
Figure 8 <i>p.39</i>	Malformations congénitales observées auprès d'agneaux ayant subi une infection transplacentaire au SBV telles l'aplasie cérébrale et cérébelleuse (A) et l'arthrogrypose (B)
Figure 9 <i>p.39</i>	Mesures réalisées au niveau des os longs, des os du crâne et de la mandibule dans le cadre de l'étude ostéométrique
Figure 10 <i>p.43</i>	Histopathologie des tissus musculaires et nerveux centraux prélevés sur des agneaux SBV (n=2) (A) hypoplasie du tissu musculaire strié squelettique (HE – x10), (B) infiltrats lymphohistiocytaires périvasculaires et nodules gliaux (Cerveau – HE – x1,25), (C) infiltrat lymphohistiocytaire périvasculaire (Cervelet – HE – x40) et (D) hypoplasie des cornes ventrales (Moelle épinière – HE – x1,25)
Figure 11 <i>p.46</i>	Description synthétique de la méthodologie déployée dans l'évaluation de la séroprévalence intra-troupeau faisant suite à l'épisode d'émergence virale connu au CRO
Figure 12 <i>p.47</i>	Description synthétique de la méthodologie déployée dans la détermination rétrospective de la période d'émergence virale connue au CRO
Figure 13 <i>p.49</i>	Détermination de la période d'émergence du SBV au CRO et événements-clés déterminants et consécutifs à celle-ci
Figure 14 <i>p.64</i>	Description synthétique de la méthodologie déployée dans le cadre des suivis virologique et sérologique du troupeau sentinelle au sein du CRO
Figure 15 <i>p.65</i>	Circulation du SBV au sein du groupe d'agnelles sentinelles (n=50) objectivée par diagnostic direct (RT-qPCR) et diagnostic indirect (VNT). Les résultats positifs cumulés (Ct<40 et log ₂ ED ₅₀ > 3,49) obtenus entre juillet et octobre 2012 sont exprimés en pourcentage.

Figure 16 <i>p.66</i>	Valeurs individuelles de CT obtenues par RT-qPCR auprès du groupe de 50 agnelles sentinelles au moment de la phase de réexpression du SBV au sein du troupeau du CRO. Les valeurs de CT sont réparties en deux groupes : les agnelles ayant présenté une seule valeur de Ct positive (n=40) et les agnelles ayant présenté deux valeurs de Ct positives à 15 jours d'intervalle (n=10).
Figure 17 <i>p.67</i>	Superposition de la période de réexpression du SBV et des périodes de lutte des lots de brebis agnelant en janvier 2013 (n= 103) et en mars/avril 2013 (n=86)
Figure 18 <i>p.70</i>	Description synthétique de la méthodologie déployée dans le cadre de l'évaluation de la séroprévalence intra-troupeau suite à l'épisode de circulation du SBV connu par le troupeau sentinelle au sein du CRO
Figure 19 <i>p.71</i>	Titres en anticorps anti-SBV évalués par VNT auprès d'agneaux nés en 2012 (groupe L12 ; n=30) et nés en 2013 (groupe L13 ; n=30) 48 heures après ingestion du colostrum. Les résultats sont exprimés sous forme de log ₂ ED ₅₀ . Les valeurs notées a et b sont significativement différentes (p<0,05).
Figure 20 <i>p.73</i>	Décroissance des anticorps colostraux anti-SBV auprès d'un groupe d'agneaux nés en 2012 de brebis ayant connu la phase d'émergence du SBV (n=30) (A) et auprès d'un groupe d'agneaux nés en 2013 de brebis ayant connu les deux épisodes de circulation virale (n=30) (B). Les résultats sont exprimés comme l'âge médian (min-max ; en jours après la naissance) auquel l'animal devient séronégatif. Les titres en anticorps sont exprimés sous forme de log ₂ ED ₅₀ .
Figure 21 <i>p.83</i>	Description synthétique du protocole déployé dans le cadre du suivi sérologique du troupeau sentinelle au sein du CRO entre le mois d'octobre 2012 et le mois de juillet 2016
Figure 22 <i>p.85</i>	Evolution des titres en anticorps anti-SBV au sein d'un groupe de brebis ayant connu la phase d'émergence virale (fin 2011) et la phase de réexpression (été 2012). Les résultats obtenus par VNT sont exprimés en valeurs médianes (min-max) du log ₂ ED ₅₀ . Les éléments notés a, b et c diffèrent significativement (p<0,05).
Figure 23 <i>p.87</i>	Arbre décisionnel utilisé pour la modélisation de l'évolution de la séroprévalence au SBV dans le troupeau du CRO tenant compte de la durée de protection colostrale chez l'agneau et de la durée de l'immunité active chez l'ovine adulte
Figure 24 <i>p.88</i>	Modélisation de l'évolution du pourcentage (A) et du nombre absolu (B) d'ovins séropositifs et d'ovins séronégatifs au SBV depuis le mois de janvier 2013 jusqu'au mois de décembre 2015 au sein du troupeau du CRO, en considérant la totalité du troupeau (jeunes individus et ovins adultes)
Figure 25 <i>p.98</i>	Description synthétique du protocole déployé dans le cadre des suivis virologique et sérologique du troupeau sentinelle au sein du CRO entre le mois d'août 2016 et le mois de septembre 2016

Liste des annexes

Annexe 1 : Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Schmallenberg virus among female lambs, Belgium, 2012. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(7):1115–1117

Annexe 2 : Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Schmallenberg virus infection of ruminants: challenges and opportunities for veterinarians. *Veterinary Medicine: Research and Reports.* 2015;6:261-272

Annexe 3 : Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Modelling the evolution of Schmallenberg virus seroprevalence in a sheep flock after natural infection. *Prev Vet Med.* 2018;154:132-138

INTRODUCTION

En Europe occidentale, les deux dernières décennies ont vu poindre et se déployer deux vagues épidémiques majeures au sein des troupeaux de ruminants domestiques : celle du virus de la langue bleue sous son sérotype 8 (BTV-8) en 2006 et, cinq ans plus tard, celle du virus de Schmollenberg (SBV). Ces événements sanitaires majeurs ont marqué les élevages bovins, ovins et caprins de l’empreinte de leur passage en termes de morbidité et de mortalité. De nombreux points de similitude sont d’ailleurs partagés par ces deux entités virales, et ce bien au-delà de leurs voies de transmission et des manifestations cliniques inhérentes à l’infection de l’organisme hôte. Du point de vue des éleveurs et des vétérinaires praticiens, elles ont ainsi, en tant que pathologies émergentes, suscité nombre de questionnements tant au sujet de la prise en charge thérapeutique des animaux cliniquement malades que des mesures prophylactiques et de régie à déployer pour prévenir l’infection des troupeaux au temps de l’émergence virale comme lors des rebonds épidémiques ultérieurs.

Au sein des secteurs d’élevage concernés, les dynamiques d’approche et de gestion des infections virales précitées se sont révélées nettement distinctes eu égard à la valeur marchande des animaux, au taux de pénétration de la profession vétérinaire dans ces secteurs et à la participation des éleveurs aux initiatives fédérales et régionales visant au diagnostic des pathologies du bétail. Ainsi, le monde de l’élevage des petits ruminants, et plus particulièrement celui de l’élevage ovin abordé dans ce travail, fait figure de milieu peu rompu à l’exercice de la surveillance syndromique, du recours au protocole avortement¹ comme des approches prophylactiques et diagnostiques. Des nombreux biais dans l’abord de l’infection naturelle par le SBV des troupeaux ovins peuvent dès lors être suspectés : absence de démarche diagnostique,

¹ Protocole avortement : appellation donnée à la collecte des commémoratifs, la réalisation et l’analyse de prélèvements d’échantillons biologiques faisant suite à un avortement dans les espèces bovine, ovine et caprine en Belgique dans le cadre historique de la surveillance de la brucellose telle que définie par l’Arrêté Royal du 22/05/2014

sous-estimation du nombre de troupeaux et d'individus atteints, faiblesse d'évaluation de l'application des protocoles de vaccination, ...

Ce travail s'attachera dans un premier temps à préciser les éléments de connaissance actuels sur le SBV et à proposer une courte typologie du secteur ovin en Belgique évoquant également l'état et le niveau de suivi sanitaires de celui-ci. Cette focalisation du propos sur l'espèce ovine s'explique par la nature des investigations qui seront décrites dans un temps second à savoir la description de l'infection naturelle par le SBV dans un troupeau ovin, évoquant tour à tour l'épisode de l'émergence virale et ses vagues ultérieures d'expression, sous des aspects multidimensionnels (anatomo-pathologique, sérologique et virologique) et pratiques (intérêts et limites des méthodes déployées, plus-values pour les éleveurs et les vétérinaires praticiens).

A. Le virus de Schmallenberg : état des lieux

A.1 Distribution temporelle et géographique du virus en Europe

Durant la période estivale de l'année 2011, des premiers signes cliniques qualifiés de « généraux » (diarrhée, baisse de production laitière et hyperthermie) ont été observés auprès de bovins laitiers issus d'exploitations situées aux Pays-Bas et en Allemagne (Hoffmann et al., 2012). Au mois de novembre de la même année, le Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) a démontré que ces manifestations étaient associées à l'infection par un nouvel agent pathogène à transmission vectorielle : celui-ci a été dénommé « virus de Schmallenberg » ou SBV en référence à la ville allemande où les premiers échantillons testés ont été collectés. Dans les semaines et mois qui ont suivi cette primo-identification, une épidémie de malformations congénitales, caractérisées par un syndrome dit « arthrogrypose-hydranencéphalie », a été observée chez les agneaux nouveau-nés, les chevreaux et les veaux dans le nord-ouest de l'Europe. Celle-ci était clairement associée à l'infection par le SBV (Luttikholt et al., 2014). Fin de l'année 2011, la Belgique, comme les Pays-Bas, ont déclaré plusieurs cas d'agneaux mort-nés ou d'agneaux nouveau-nés présentant de l'arthrogrypose et des anomalies développementales cérébrales (De Regge et al., 2013). Les élevages affectés étaient principalement situés dans le nord de la Belgique près de la frontière néerlandaise. Au début du printemps 2012, le nombre total rapporté de troupeaux touchés s'élevait à 3.628 (bovins 1.115, ovins 2.440, caprins 73) dans huit pays (ProMED-mail, 2012). La séroprévalence élevée du SBV au sein des troupeaux (jusqu'à 98,03 %) dans les zones géographiques ayant signalé des épidémies de SBV fin 2011 laissait penser que les possibilités de réémergence du virus en 2012 étaient limitées (Elbers et al., 2012).

Pourtant, un nouvel épisode de SBV s'est déclaré durant l'été 2012 dans les régions précédemment touchées (Claine et al., 2015). En Allemagne, de nouveaux cas d'infection ont été observés dans des exploitations bovines, ovines et caprines dès le mois de juin 2012

prouvant la capacité du virus à circuler de nouveau après la période hivernale (Conraths et al., 2013). En 2012 et 2013, le SBV s’est ainsi répandu dans toute l’Europe. Fin septembre 2013, un total de 27 pays européens était considéré comme infecté par le SBV (Pro-MED mail, 2014). La dispersion virale dans les pays du continent européen ayant déclaré des cas d’infection par le SBV au sein de leurs troupeaux bovins, ovins ou caprins, ou ayant détecté des anticorps dans le sérum ou le lait entre l’été 2011 et la fin de l’année 2014 est présentée sous forme de liste cumulée (**tableau 1**) et cartographiée (**figure 1**).

Tableau 1 : Pays du continent européen ayant rapporté des cas d’infection par le SBV dans les troupeaux bovins et/ou ovins et/ou caprins, ou ayant détecté des anticorps anti-SBV dans le sérum ou le lait entre le 2^{ème} semestre de l’année 2011 et le 2^{ème} semestre de l’année 2014 (modifié d’après Claine et al., 2015)

Année	2011		2012		2013		2014	
	1 ^{er} semestre	2 ^{ème} semestre						
Pays ayant rapporté des cas de SBV (classés par ordre chronologique)		Pays-Bas	Pays-Bas	<u>Pays-Bas</u>	Pays-Bas	<u>Pays-Bas</u>	Pays-Bas	Pays-Bas
		Allemagne	Allemagne	<u>Allemagne</u>	<u>Allemagne</u>	<u>Allemagne</u>	<u>Allemagne</u>	Allemagne
		Belgique	Belgique	<u>Belgique</u>	<u>Belgique</u>	<u>Belgique</u>	<u>Belgique</u>	<u>Belgique</u>
		Royaume-Uni	Royaume-Uni	<u>Royaume-Uni</u>	<u>Royaume-Uni</u>	<u>Royaume-Uni</u>	<u>Royaume-Uni</u>	<u>Royaume-Uni</u>
			France	<u>France</u>	<u>France</u>	<u>France</u>	<u>France</u>	<u>France</u>
			Italie	<u>Italie</u>	<u>Italie</u>	<u>Italie</u>	<u>Italie</u>	<u>Italie</u>
		Luxembourg	Luxembourg	Luxembourg	Luxembourg	Luxembourg	Luxembourg	Luxembourg
		Espagne	Espagne	Espagne	Espagne	Espagne	Espagne	Espagne
		Danemark	Danemark	Danemark	Danemark	Danemark	Danemark	Danemark
			Suisse	Suisse	Suisse	Suisse	Suisse	Suisse
			Autriche	Autriche	Autriche	Autriche	Autriche	Autriche
			Pologne	Pologne	Pologne	Pologne	Pologne	Pologne
			Suède	Suède	Suède	Suède	Suède	Suède
			Finlande	Finlande	Finlande	Finlande	Finlande	Finlande
			Irlande	Irlande	Irlande	Irlande	Irlande	Irlande
			Norvège	Norvège	Norvège	Norvège	Norvège	Norvège
			Rep. Tchèque	Rep. Tchèque	Rep. Tchèque	Rep. Tchèque	Rep. Tchèque	Rep. Tchèque
			Croatie	Croatie	Croatie	Croatie	Croatie	Croatie
			Hongrie	Hongrie	Hongrie	Hongrie	Hongrie	Hongrie
			Slovénie	Slovénie	Slovénie	Slovénie	Slovénie	Slovénie
			Lettonie	Lettonie	Lettonie	Lettonie	Lettonie	Lettonie
			Estonie	Estonie	Estonie	Estonie	Estonie	Estonie
			Serbie	Serbie	Serbie	Serbie	Serbie	Serbie
			Roumanie	Roumanie	Roumanie	Roumanie	Roumanie	Roumanie
			Lituanie	Lituanie	Lituanie	Lituanie	Lituanie	Lituanie
			Russie	Russie	Russie	Russie	Russie	Russie
					Grèce	Grèce	Grèce	Grèce
					Portugal	Portugal	Portugal	
					Turquie	Turquie	Turquie	

Les pays ayant rapporté une phase de ré-émergence en 2012 sont soulignés. Les pays ayant rapporté un troisième épisode de circulation virale en 2014 sont en caractères gras.

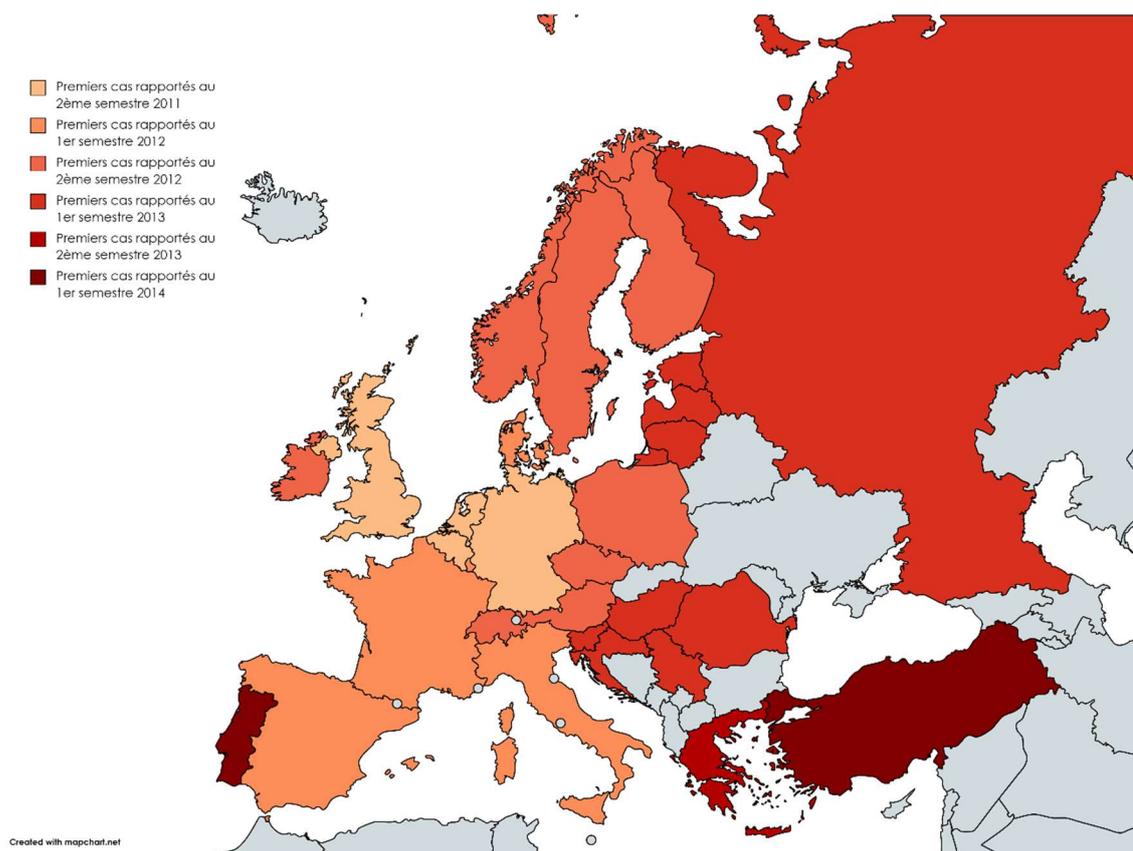


Figure 1 : Pays du continent européen ayant rapporté des cas d'infection par le SBV dans les troupeaux bovins et/ou ovins et/ou caprins, ou ayant détecté des anticorps anti-SBV dans le sérum ou le lait entre le 2^{ème} semestre de l'année 2011 et le 2^{ème} semestre de l'année 2014 (modifié d'après Claine et al., 2015)

Le SBV s'est ainsi propagé d'une manière extrêmement rapide et sur de grands territoires, comparativement au BTV quelques années auparavant (Sedda and Rogers, 2013). Ceci est directement lié au taux de réplication du virus ainsi que la probabilité élevée de transmission entre l'organisme vecteur et l'organisme hôte (Gubbins et al., 2014). Le taux reproductif de base (R_0) du SBV est ainsi estimé à 6,2 pour les exploitations bovines et 7,6 pour les exploitations ovines (Gubbins et al., 2014). Comme mentionné par Collins et al. (2016) dans leur étude, l'approche du taux reproductif effectif (R_e), produit de la multiplication du R_0 par le pourcentage d'animaux naïfs dans un troupeau, illustre l'incroyable potentiel du SBV de circuler à nouveau dans les troupeaux malgré ses vagues épidémiques passées et l'immunité qu'elles ont pu engendrer.

Ainsi, de nouveaux épisodes de circulation du SBV ont été mis en évidence dans les années qui ont suivi : fin 2014 aux Pays-Bas et en Allemagne (Pro-MED mail, 2014), en 2016 au Royaume-Uni et en Belgique (Delooz et al., 2017). Malgré ces multiples vagues de rebond épidémique, le nombre de troupeaux infectés par le SBV a constamment diminué entre les années 2012 et 2015 (Méroc et al., 2015).

Hors des frontières européennes, le SBV a été également détecté en Chine (Zhai et al., 2018), en Iran (Rasekh et al., 2018), au Liban (Abi-Rizk et al., 2017) et sur le continent africain (Molini et al., 2018) notamment. Cette possible expansion géographique du SBV doit cependant être relativisée en raison de la seule utilisation de tests sérologiques à des fins de détection de celui-ci. En effet, la faible spécificité des tests sérologiques fait craindre des réactions croisées avec d'autres virus du même séro groupe circulant dans les régions et pays évoqués (Collins et al., 2019). Cette hypothèse permet également d'expliquer la raison pour laquelle des anticorps dirigés contre le SBV ont été détectés en Turquie dans des prélèvements sanguins réalisés auprès de troupeaux de ruminants avant l'année 2011 (Azkur et al., 2013).

A.2 Eléments de virologie moléculaire

Le SBV est un virus du séro groupe Simbu, appartenant au genre Orthobunyavirus (famille des Peribunyaviridae, ordre des Bunyavirales) (Collins et al., 2019). Au sein de ce séro groupe, nombre de représentants sont des entités virales bien connues en Afrique, en Océanie et au Moyen-Orient à l'instar des virus Akabane (AKAV), Aino (AINO) ou encore Shamonda (SHAV) (Saeed et al., 2001). L'infection par ceux-ci entraîne par ailleurs un épisode clinique fort comparable à celui rencontré en cas d'infection par le SBV (EFSA, 2014).

La première identification du SBV a été réalisée par le FLI au mois de novembre 2011 à partir d'échantillons sanguins prélevés sur des bovins présentant des signes cliniques telles la diarrhée associée à une baisse de la production de lait et l'hyperthermie. L'analyse

métagénomique réalisée a indiqué la parenté du SBV avec des virus du séro groupe Simbu (Hoffmann et al., 2012). Si ceux-ci affectent principalement les ruminants, aucun d'entre eux n'avait été détecté jusqu'alors en Europe. Certains auteurs ont rapidement suggéré que le SBV pourrait être issu d'un réassortiment entre le virus Sathuperi (SATV) et SHAV (Yanase et al., 2012), tandis que d'autres ont formulé l'idée que le SBV pourrait être un ancêtre de SHAV (Goller et al., 2012). Le SBV présente en tout cas un haut degré de similarité des séquences de ces segments ARN avec SHAV et SATV (Yanase et al., 2012 ; Goller et al., 2012). Le manque d'isolats viraux associés aux SATV et SHAV ayant émergé et s'étant dispersés ces dernières décennies rend difficile l'établissement d'un scénario évolutif clair entre le SBV et ceux-ci (Coupeau et al., 2019). Coupeau et al. (2019) ont cependant démontré la possibilité de créer des réassortants entre SHAV et SATV suite à des co-infections *in vitro* de cellules de mammifères et d'insectes.

a) Structure et génome

Les particules de SBV sont enveloppées et présentent un diamètre d'environ 100 nm. Le SBV est un virus à ARN monocaténaire de sens négatif dont le génome est composé de trois segments : un grand (L), un moyen (M) et un petit (S). Le segment L code pour l'ARN polymérase ARN-dépendante. Le segment M code pour une polyprotéine précurseur des protéines d'enveloppe Gn et Gc et de la protéine non structurale NSm. Ce segment est considéré, par ailleurs, comme disposant du caractère le plus variable au sein du génome du SBV. Une étude belge menée en 2013 a montré que la protéine Gc contenait un domaine N-terminal qui accumule des mutations dans le cours naturel de la propagation du SBV au sein des troupeaux (Coupeau et al., 2013). Ce résultat suggère que la variabilité identifiée dans ce domaine peut ouvrir la porte à un mécanisme d'évasion immunitaire (Coupeau et al., 2013 ; Fischer et al., 2013). Enfin, le segment S code pour la nucléoprotéine N et la protéine non structurale NSs. A l'instar d'autres virus de l'ordre des Bunyavirales, la protéine non structurale

NSs du SBV est un facteur de virulence majeur capable de déréguler la production d'interféron de type 1 dans les cellules de mammifères, accroissant ainsi le potentiel de réplication virale (Varela et al., 2013 ; Elliott et al., 2013). Une représentation du SBV et de l'organisation de son génome est proposée en **figure 2 (A et B)**, d'après Endalew et al. (2019).

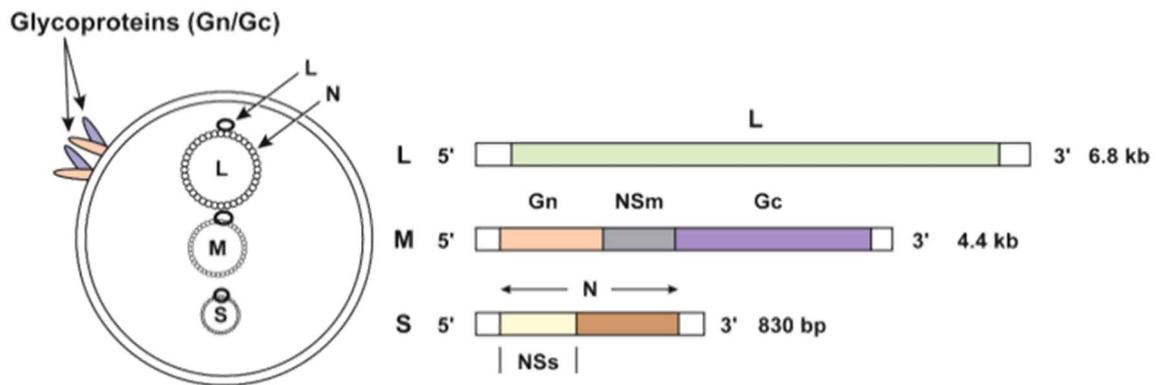


Figure 2 : Représentation du SBV et de l'organisation de son génome. (A) Les segments large (L), medium (M) et small (S) sont encapsulés dans une enveloppe à bicouche lipidique présentant les glycoprotéines de surface Gn et Gc. (B) Le segment L code pour l'ARN polymérase ARN-dépendante, le segment M pour une polyprotéine précurseur des glycoprotéines de surface et la protéine non structurale NSm et le segment S pour la nucléoprotéine N et la protéine non structurale NSs (modifié d'après Endalew et al., 2019).

b) Cycle viral

Après une phase d'attachement à la membrane de la cellule hôte médiée par les glycoprotéines Gn et Gc, c'est au travers d'un processus d'endocytose « clathrine dépendant » que le SBV intègre le milieu cellulaire. Ses nucléoprotéines sont ensuite dispersées dans le cytosol au terme d'une acidification de l'endosome. Les mécanismes de transcription et de réplication virales précèdent l'assemblage des virions dans l'appareil de Golgi et leur encapsidation. Des vésicules d'exocytose les convoient alors en direction du compartiment extracellulaire dans lequel ils sont évacués après fusion membranaire des dites vésicules (Cifuentes-Munoz et al., 2014).

Dans une récente étude, Thamamongood et al. (2020) ont mis en évidence l'implication d'une sulfotransférase en tant que promoteur de l'entrée cellulaire du SBV. Ainsi,

l'infection de lignées cellulaires délétées du gène codant pour cette enzyme semble perturbée : l'attachement du SBV à la surface cellulaire et son entrée dans le cytosol sont considérablement réduits.

c) Virémie

En cas d'infection par le SBV, les signes cliniques observés chez les animaux adultes peuvent être qualifiés de fugaces : ils sont liés à la courte période de virémie. Ces observations ont été confirmées après les premières infections expérimentales chez les veaux : les animaux inoculés se sont infectés, révélés PCR positifs dès 48h post-challenge et le sont restés jusqu'à 5 jours après l'infection (Hoffmann et al., 2012). Après infection expérimentale chez le mouton, la positivité du test PCR s'est marquée 48h post-challenge et s'est maintenue jusqu'à 7 jours après l'infection. Il a en outre été démontré que la durée et l'intensité de la virémie semblent être indépendantes de la dose infectieuse (Poskin et al., 2014). Cependant, en cas d'infection naturelle par le SBV, la durée de la virémie chez les moutons paraît être plus longue. En effet, 20% d'un groupe d'agnelles sentinelles naturellement infectées par le SBV ont été trouvées PCR positives à 2 semaines d'intervalle (Claine et al., 2013).

En outre, il semble que les charges virales les plus élevées ont été décelées dans les ganglions lymphatiques mésentériques de la plupart des animaux étudiés (Hechinger et al., 2013).

A.3 Transmission du virus et espèces sensibles

a) Transmission vectorielle

La plupart des bunyavirus présents en Asie ou en Afrique sont transmis par un insecte vecteur (moucheron piqueur ou moustique) (Rasmussen et al., 2012). Lorsque le SBV est apparu en 2011 en Europe, les moucheron piqueur du complexe d'espèces *Obsoletus* et du genre *Culicoides* ont été rapidement identifiés comme les vecteurs du SBV. En effet, le génome

viral a été détecté chez différents *Culicoides* spp. (*Culicoides dewulfi*, *Culicoides chiopterus*, *Culicoides punctatus*, etc) capturés dès l'été et l'automne 2011 en Belgique (De Regge et al., 2012), en Italie (Goffredo et al., 2013), aux Pays-Bas (Elbers et al., 2013) et au Danemark (Rasmussen et al., 2012). En conditions de laboratoire, les phénomènes de réplication et de dissémination du SBV ont également été détectés chez *Culicoides sonorensis* (De Regge et al., 2014 ; Veronesi et al., 2013).

Environ 120 espèces différentes de culicoïdes sont décrites en Europe. Le complexe *Obsoletus* est le plus abondant dans les fermes européennes (Mellor, 2004). Les moucheron piqueurs du genre *Culicoides* sont impliqués dans la transmission de plusieurs virus du séro groupe Simbu. Ils ont été reconnus comme des vecteurs majeurs du BTV-8 en Europe du Nord et centrale lors de l'épidémie de 2006 (Lehmann et al., 2012). Cependant, leur compétence à transmettre le SBV est de loin supérieure à celle du BTV que ce soit dans le nombre d'espèces comme dans la proportion d'individus au sein d'une même espèce capables de disséminer le virus (EFSA, 2014).

La compréhension de l'écologie et du comportement des *Culicoides* spp. est un élément d'importance car ce sont là des informations qui permettent de mieux appréhender l'épidémiologie des agents pathogènes qu'ils transmettent (Sanders et al., 2011). Le cycle de vie des culicoïdes dépend intimement des conditions météorologiques. Leur vol appétitif est par exemple conditionné par la température, l'humidité, l'intensité lumineuse et la vitesse du vent (Burgin et al., 2013). De plus, la capacité des *Culicoides* spp. à hiverner et servir de réservoir à de nouvelles infections l'année suivante a été établie dans le cadre des épidémies de BTV et de SBV (Koenraadt et al., 2014). Même s'il n'y a aucune preuve que d'autres espèces d'insectes (par exemple, les moustiques) sont impliquées dans la transmission du SBV (Wernike et al., 2014), une transmission mécanique par des insectes hématophages pourrait se produire comme pour les autres virus du groupe Simbu (Scholte et al., 2014). Cependant, à ce

jour, toutes les études menées sur d'autres espèces d'insectes que les culicoïdes, à savoir celle de Balenghien et al. (2014) sur *Aedes albopictus* et *Culex pipiens* mais aussi celle de Kameke et al. (2016) sur *Simulidae*, ont révélé le caractère « non-vecteur » de celles-ci.

Le cycle de transmission virale entre hôte et vecteur peut se résumer de la manière suivante : un culicoïde non infecté prend un repas sanguin auprès d'un hôte ruminant (bovin, ovin ou caprin) infecté. Pour pouvoir ensuite être transmis, le SBV doit alors migrer depuis l'intestin moyen de l'insecte vers ses glandes salivaires, site de multiplication virale. Ce culicoïde devient alors lui-même infectieux, à savoir que le virus se réplique à un niveau compatible pour être transmissible durant une phase d'incubation dite extrinsèque dont la durée varie de 9 à 41 jours (Haider et al., 2018). La transmission du virus à l'organisme hôte s'établit dès lors qu'une femelle culicoïde pique un animal immunitairement naïf et lui transmet le virus via sa salive. La période d'incubation intrinsèque, c'est-à-dire la période de multiplication virale chez l'hôte, s'étale, quant à elle, sur une période de 2 à 6 jours (Hoffmann et al., 2012).

b) Transmission transplacentaire et vénérienne

Si la transmission vectorielle est largement décrite pour le SBV chez l'animal adulte, les *fœti* peuvent être infectés par voie transplacentaire pour autant que l'infection virale survienne pendant la période dite critique de la gestation. *A contrario*, aucune preuve de transmission horizontale (d'animal à animal) n'a été détectée (Collins et al., 2019). Outre la transmission vectorielle, au demeurant la voie la plus courante d'infection par le SBV, les chercheurs ont démontré que l'ARN du SBV pouvait être retrouvé dans le sperme de bovin sans pour autant conclure à un risque de transmission vénérienne (Schulz et al., 2014 ; Ponsart et al., 2014).

c) Espèces sensibles

De nombreuses espèces ont été reconnues comme sensibles à l'infection par le SBV. Le **tableau 2** résume les espèces animales dans lesquelles une détection directe et/ou indirecte du SBV a été réalisée et l'expression clinique liée à l'infection chez les adultes et/ou leur progéniture le cas échéant. Ainsi, il apparaît que seuls les ruminants domestiques (bovins, ovins, et caprins) ont exprimé les manifestations cliniques consécutives à l'infection par le SBV. La détection indirecte de l'agent pathogène (sérologie réactionnelle au SBV) s'est révélée positive auprès de ruminants sauvages (par exemple, alpaga, buffle, bison), issus de parcs zoologiques (par exemple, koudou, zèbre, oryx) mais aussi auprès d'autres espèces de mammifères (par exemple, cheval, sanglier). Dans l'espèce canine, *a contrario*, des signes virologiques et sérologiques d'infection par le SBV ont été détectés.

Tableau 2 – Espèces de mammifères sensibles au SBV et voies d’identification de l’infection virale : signes cliniques chez l’animal adulte (A) et/ou le nouveau-né (N), diagnostic direct (génomme viral) par RT-PCR et diagnostic indirect (anticorps anti-SBV) par VNT ou ELISA (modifié d’après Claine et al., 2015)

Espèces	Signes cliniques	Diagnostic direct (génomme)	Diagnostic indirect (anticorps anti-SBV)
Alpaga		x	x
Buffle		x	x
Bison		x	x
Bovin	x (A et N)	x	x
Cerf Elaphe			x
Cerf Sika			x
Chameau			x
Chamois			x
Cheval			x
Chèvre	x (rare)	x	x
Chevreuil			x
Chien		x	x
Elan			x
Daim			x
Mouflon			x
Mouton	x (N)	x	x
Muntjac			x
Sanglier			x

L’infection expérimentale par le SBV a été effectuée sur des volailles, mais les résultats indiquent l’absence de répllication virale (EFSA, 2014). En raison de leur rôle évocateur dans l’épidémiologie de AKAV, le rôle des porcs dans l’épidémiologie du SBV a

enfin été évalué. En effet, alors que AKAV est traditionnellement considéré comme un pathogène de mammifères herbivores, Huang et al. (2003) ont démontré l'infection naturelle par voie oro-nasale de lots de porcs et l'excrétion de particules virales via les écoulements nasaux et oculaires, traduisant le rôle des porcs dans le cycle de transmission du virus. Auprès de porcelets infectés expérimentalement par SBV, seule la séroconversion a été observée soulignant l'incapacité du virus à se répliquer (Poskin et al., 2014).

A.4 Manifestations cliniques de l'infection au SBV

L'image clinique de l'infection au SBV doit être distinguée chez le ruminant adulte et chez le fœtus en cas d'infection *in utero*. L'infection par le SBV chez le premier est fréquemment associée à une absence de signe clinique spécifique. Chez les bovins, elle est associée à un épisode fébrile accompagné d'une réduction de la production de lait (jusqu'à 50 %), de l'inappétence et de la diarrhée (Sedda et al., 2013). Ce syndrome fébrile non spécifique a été rapporté durant l'été et l'automne 2011 chez des vaches laitières adultes issues d'exploitations néerlandaises et allemandes (Bayrou et al., 2014). L'épisode clinique n'excède pas six jours et ce en lien direct avec la courte phase de virémie (Wernike et al., 2013). Chez les ovins et les caprins, l'infection par le SBV reste subclinique. Seul un petit nombre de troupeaux a relaté des cas aigus chez les adultes (6 % pour les bovins, 1 % pour les caprins et 3 % pour les ovins) (Afonso et al., 2014).

En décembre 2011, les Pays-Bas ont notifié l'effet tératogène de l'infection par le SBV chez les ovins : les manifestations cliniques observées étaient comparables à celles présentées en cas d'infection par AKAV et AINO (Kurogi et al., 1975 ; Tsuda et al., 2004). Divers troubles congénitaux ont été détectés chez les *fœti* avortés ou les ruminants mort-nés (ovins, caprins, et bovins). Les déformations musculo-squelettiques étaient souvent observées sur les membres postérieurs et antérieurs, la colonne vertébrale, l'encolure et la tête. Il s'agissait

essentiellement d'arthrogrypose, de lordose, de scoliose, de torticolis et de brachygnathie inférieure (Herder et al., 2012). Même si ces lésions peuvent être associées à d'autres facteurs, une *spina bifida* sacrée et une fente palatine ont été observées en 2013 chez deux agneaux mort-nés SBV-positifs (Claine et al., 2013). En cas de gestation gémellaire, un jumeau pouvait présenter des malformations précédemment décrites, tandis que l'autre ne présentait que des troubles neurologiques voire aucun signe clinique (Doceul et al., 2013). Macroscopiquement, les malformations courantes du système nerveux central (SNC) chez les jeunes ruminants observées pendant l'autopsie étaient l'hydranencéphalie, la porencéphalie, la lissencéphalie, l'hydrocéphalie, l'hypoplasie cérébelleuse et cérébrale, et la micromyélie. Les lésions histologiques étaient évocatrices d'une méningoencéphalomyélite lymphohistiocytaire tandis que la présence de nodules gliaux a été sporadiquement observée dans le mésencéphale et l'hippocampe d'agneaux et de chevreaux, ainsi que de la dégénérescence neuronale et de la nécrose principalement dans le tronc cérébral des veaux. De l'hypoplasie myofibrillaire a été observée chez les agneaux et les veaux (Herder et al., 2012). Il a été suggéré que les lésions observées au niveau de la moelle épinière étaient responsables de l'immobilité fœtale favorisant l'arthrogrypose (Bayrou et al., 2014). La présence de lésions musculo-squelettiques dues à des malformations du SNC chez les *fœti* ou les nouveau-nés avortés infectés par le SBV a conduit à l'expression « syndrome AG-HE » pour « arthrogrypose » et « hydranencéphalie », terme souvent utilisé pour décrire les déformations induites par le SBV. La **figure 3** présente le tableau lésionnel quasi pathognomonique des agneaux mort-nés atteints de SBV.

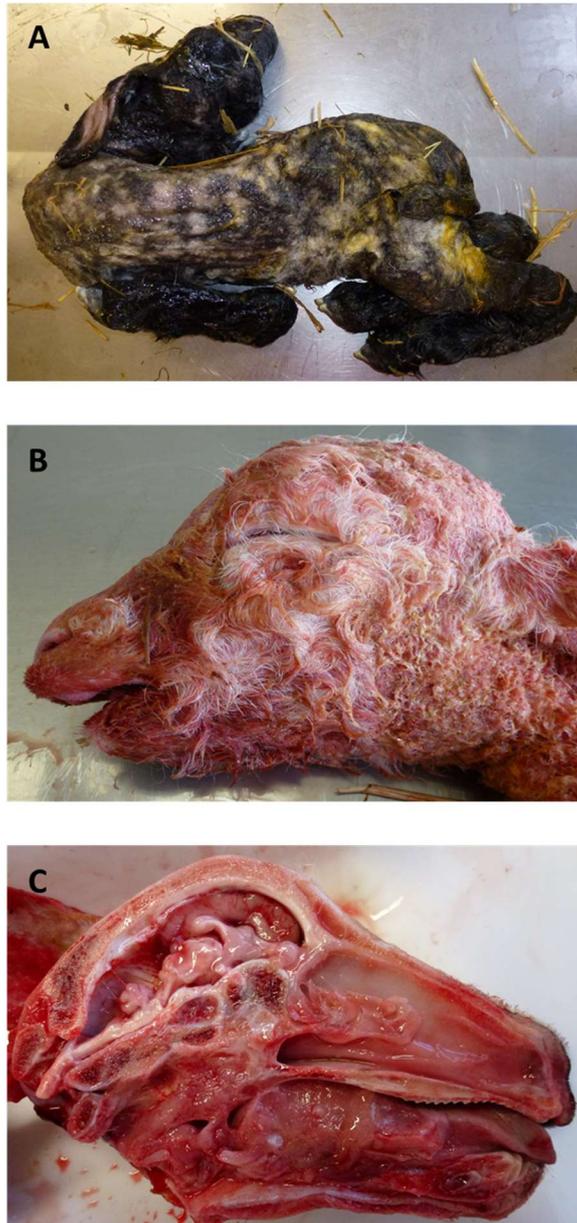


Figure 3 : Infection au SBV chez l'agneau nouveau-né présentant de l'arthrogrypose, de la scoliose et un torticollis (A), une brachygnathie inférieure (B) et une hypoplasie cérébrale/cérébelleuse (C) (modifié d'après Claine et al., 2015)

Le moment de l'infection par rapport au stade de gestation, et donc au stade de développement fœtal, semble déterminer la gravité des malformations décelées (Steukers et al., 2012). En raison de nombreuses similitudes entre les caractéristiques cliniques des infections par le SBV et AKAV chez les nouveau-nés, la période de gestation à haut risque chez les ruminants semble partagée. Pour AKAV, elle est estimée comprise entre le 28^e et le 36^e jour

de gestation en ovins, le 30^e et le 50^e jour chez les caprins, et le 76^e et le 174^e jour chez les bovins (Kirkland et al., 1988).

Des infections expérimentales menées sur des populations ovines et caprines corroborent ces éléments de temporalité : un passage transplacentaire avec manifestations lésionnelles est démontré à 28 et 42 jours de gestation chez la chèvre (Laloy et al., 2017) tandis que l'infection aux jours 45 et 60 de gestation chez la brebis n'engendre aucun tableau lésionnel dans sa progéniture (Martinelle et al., 2015).

L'étude menée par Wernike et al. (2014) a tenté de définir plus précisément la phase critique pour les bovins en cas d'infection naturelle par le SBV des vaches gestantes. Des veaux malformés sont nés après un épisode d'infection transplacentaire entre les jours 60 et 144 de la gestation, ce qui correspond au délai critique décrit pour les virus étroitement liés au SBV. L'infection par le SBV des ruminants sauvages ou d'autres espèces de mammifères (par exemple, les chiens) n'était pas, quant à elle, associée à quelque manifestation clinique ou malformation. A ce jour, aucune preuve d'infection virale chez l'humain n'a été signalée (Reusken et al., 2012).

A.5 Eléments de pathogénie virale

La pathogénie des lésions consécutives à l'infection transplacentaire au SBV s'explique premièrement par une colonisation virale du système reproducteur femelle ciblant les zones d'échanges foeto-maternels (Martinelle et al., 2015) dont le caractère aléatoire peut dès lors impacter seule une fraction ou la totalité d'une portée (Laloy et al., 2017). Une fois le fœtus atteint, une amplification virale primaire se produit dans de multiples tissus avant de cibler préférentiellement le système nerveux central. Le SBV s'y multiplie dans les neuroblastes et les neurones. Les motoneurones des cornes ventrales de la moelle épinière n'y font pas

exception entraînant de l'atrophie musculaire et, *in fine*, l'immobilité fœtale dont l'arthrogrypose est la traduction manifeste (Peperkamp et al., 2015).

Il semble en tout cas évident que la pathogénicité du SBV vis-à-vis de l'embryon ou du fœtus bénéficie d'un élément promoteur à savoir l'entrée en fonction des placentomes (28^{ème} jour de gestation), véritables « ponts » permettant au virus d'atteindre le fœtus, et souffre d'éléments inhibiteurs comme le développement de la barrière hémato-méningée (60^{ème} jour de gestation) et la mise en place de l'immunité fœtale (début du 2^{ème} tiers de gestation) (Bayrou, 2019).

A.6 Outils diagnostiques

Poser le diagnostic de l'infection par le SBV chez les animaux adultes vivants est une démarche difficile pour les vétérinaires praticiens. Comme mentionné précédemment, cette infection est le plus souvent subclinique chez les ruminants adultes ou caractérisée, surtout chez les bovins, par un syndrome fébrile. Ces signes cliniques pourraient être observés en cas d'autres infections virales (p. ex., virus de l'herpès bovin de type 1, fièvre catarrhale du mouton induite par le bluetongue virus, virus de la fièvre aphteuse) (Hoffmann et al., 2011). L'infection transplacentaire, quant à elle, est bien plus évocatrice : les malformations congénitales du SNC et du système musculo-squelettique tels le syndrome AG-HE, l'aplasie ou l'hypoplasie du cerveau ou du cervelet et l'hydranencéphalie présenté par des *fœti* avortés, des individus morts-nés ou des ruminants nouveau-nés sont suggestives. Cependant, en raison de similitudes entre les caractéristiques cliniques du SBV et d'autres virus spécifiques aux ruminants à l'instar du BTV, seul le diagnostic virologique et/ou sérologique de laboratoire peut confirmer l'hypothèse d'un épisode de SBV.

Le diagnostic direct de l'infection par le SBV peut être réalisé par réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel (RT-qPCR) développée initialement par le FLI

(Allemagne) en 2011 sur le segment L du génome du SBV. Des protocoles ciblant les segments S et M ont ensuite été développés. Il apparaît que la détection de l'ARN du SBV est d'une sensibilité et d'une spécificité plus élevées au moyen du protocole ciblant le segment S (Fischer et al., 2013). De multiples organes ont été testés par RT-PCR mais certains d'entre eux semblent plus appropriés pour la détection du SBV (Collins et al., 2019). Il a été ainsi établi que le cerveau, la moelle épinière, le liquide placentaire et le cordon ombilical sont les tissus les plus appropriés pour détecter le SBV chez les agneaux ou des veaux malformés (Bilk et al., 2012). De faibles valeurs de cycles-seuil (Ct) ont également été obtenues dans les glandes surrénales et les gonades (Coupeau, communication personnelle). Le tronc cérébral semble être également un tissu approprié pour effectuer un diagnostic direct d'infection par le SBV, au même titre que le méconium et le sérum pré-colostral (De Regge et al., 2013). En outre, cette technique de diagnostic direct peut également être employée dans le but de détecter l'ARN de l'agent pathogène dans les populations de vecteurs (Balenghien et al., 2014).

Outre la RT-qPCR, la détection des anticorps anti-SBV présents dans le sérum des animaux infectés au travers de tests dits de neutralisation (VNT) et de dosage immuno-enzymatique (ELISA) permet de confirmer l'infection par le SBV, ce y compris l'infection transplacentaire lorsque l'analyse est opérée sur sang fœtal ou sérum pré-colostral (Collins et al., 2019). Parmi ces outils de diagnostic sérologique, l'ELISA est plus rapide, moins cher, et permet de tester un plus grand nombre d'échantillons (Doceul et al., 2013) mais la possibilité de réactions croisées avec d'autres Orthobunyavirus du séro-groupe Simbu existe (Bréard et al., 2013). De plus, les tests ELISA sont également capables de détecter les anticorps anti-SBV dans le lait (Humphries and Burr, 2012). La détection d'anticorps anti-SBV sur prélèvements de lait de tank peut ainsi renseigner sur la séroprévalence intra-troupeau et constituer un outil de surveillance pour contrôler les dynamiques d'infection virale dans les troupeaux bovins laitiers (Collins et al., 2017). Daly et al. (2015) ont par ailleurs démontré dans leur étude que

les titres en anticorps individuellement évalués dans le lait sont significativement plus élevés que dans le sérum. Cependant, de nombreuses divergences ont été constatées en comparant les résultats obtenus par VNT et ceux obtenus par les tests ELISA. Il semble que les tests ELISA présentent une spécificité et une sensibilité inférieures (van der Poel et al., 2014). La **figure 4** résume les méthodes de diagnostic de l'infection par le SBV les plus couramment utilisées chez les ruminants (signes cliniques observés chez les animaux adultes et chez les *fœti* avortés, les mort-nés, ou nouveau-nés, diagnostic virologique direct par RT-PCR et diagnostic sérologique indirect par VNT ou ELISA).

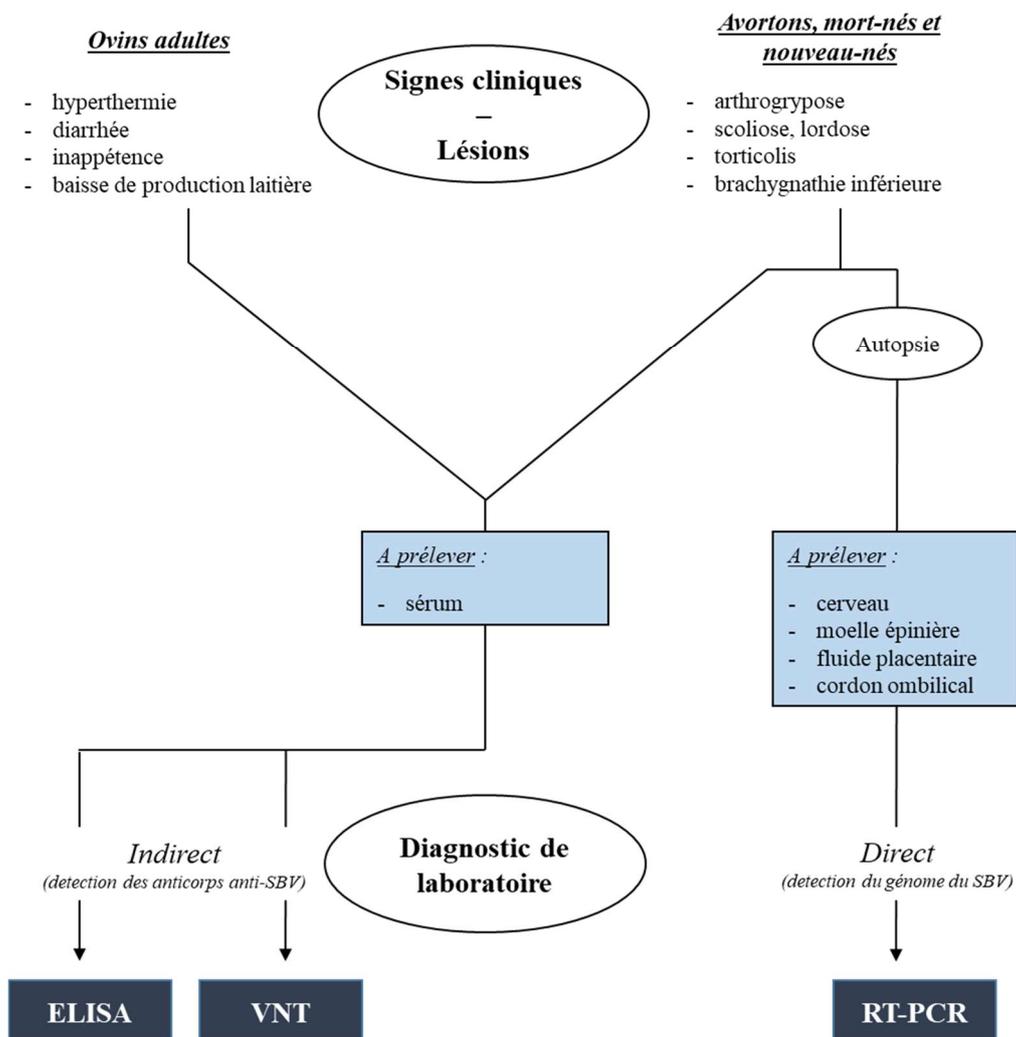


Figure 4 : Diagnostic de l'infection par le SBV sur base de l'observation des signes cliniques (ovins adultes) ou des lésions (avortons, mort-nés et nouveau-nés) complétée par les principales démarches proposées par les laboratoires en termes d'approche indirecte (ELISA et VNT) ou directe (RT-PCR) (modifié d'après Claine et al., 2015)

Outre les méthodes mentionnées précédemment, il est nécessaire de préciser que l'infection par le SBV peut également être mise en évidence par immunofluorescence et isolement viral (Tarlinton et al., 2012) mais ces deux techniques ne sont pas utilisées en routine pour le diagnostic. La détection des protéines et de l'ARN du SBV dans des coupes de paraffine peut être réalisée par immunochimie et hybridation *in situ* (Gerhauser et al., 2014). *In vitro*, des cellules d'insectes comme les KC (*Culicoides variipennis* cell line) ainsi que des cellules de mammifères comme les Vero (African Green Monkey) ou les BHK (Baby Hamster Kidney) sont les hôtes renseignés pour assurer l'isolement du SBV (Hoffmann et al., 2011 ; Wernike et al., 2013).

A.7 Mesures de suivi, de prévention et de contrôle

La surveillance des populations vectorielles et le suivi de la présence du virus au sein de celles-ci représentent certainement les méthodes les plus appropriées pour prédire les futurs épisodes de circulation du SBV. Nombre de systèmes de surveillance ont été ainsi déployés en Europe incluant la surveillance syndromique, le suivi de populations sentinelles, des études de séroprévalence et l'évaluation de la présence du pathogène tant chez les animaux que chez les vecteurs (Collins et al., 2019). Un modèle de dispersion des culicoïdes a même été mis au point en Irlande afin de monitorer le risque d'incursion de ces vecteurs depuis le Royaume-Uni et l'Europe continentale (Mc Grath et al., 2018). Le recours à ces systèmes de surveillance a ainsi permis d'identifier plusieurs épisodes consécutifs de réémergence virale dans de nombreux pays européens (Collins et al., 2019).

Le contrôle à grande échelle des larves ou des formes adultes de *Culicoides spp.* est, quant à lui, considéré comme irréalisable en raison de la vaste gamme et de l'abondance de leurs habitats (Carpenter et al., 2008). En outre, l'usage de produits insecticides à des fins d'éloignement voire de destruction des insectes vecteurs dans un but de prévenir et/ou de

contrôler la propagation du SBV au sein des troupeaux ne s'est pas révélé fructueux. Wernike et al. (2014) ont ainsi démontré l'inefficacité de ces traitements insecticides dans une étude cas-témoin.

Si, parmi les mesures prophylactiques déployables, la vaccination doit être considérée comme une mesure capable de réduire l'impact de l'infection par le SBV (Tarlinton et al., 2012), il n'en demeure pas moins que son coût, combiné à l'effet limité voire faible de l'infection par le SBV sur les troupeaux, soulève de réelles questions sur la pertinence de son emploi. Wernike et al. (2013) et Hechinger et al. (2014) ont très rapidement élaboré des prototypes vaccinaux destinés aux populations bovines et ovines, respectivement. Sur le marché, trois vaccins inactivés ont été consécutivement produits pour une utilisation chez le bovin et l'ovin : Bovilis SBV® (MSD Animal Health), Zulvac® (Zoetis) et SBVvax® (Merial). La vaccination se focalise sur les animaux reproducteurs avant mise à la reproduction, et ce afin de prévenir les infections fœtales. Les études menées par Elbers et al. (2014) auprès d'une population bovine et par Claine et al. (2014) auprès d'une population ovine ont distillé des informations de premier intérêt. En effet, le déploiement d'une stratégie vaccinale est conditionné par la connaissance de la durée de l'immunité au long terme contre le SBV comme de la durée de l'immunité colostrale chez les nouveau-nés. Cette dernière question relève d'un intérêt primordial car l'immunité passive reçue au travers de l'ingestion et de l'absorption du colostrum peut directement interférer avec l'efficacité du vaccin. Ainsi, chez les bovins, l'immunité active persiste au moins deux ans après l'infection naturelle par le SBV. En outre, les veaux pourraient être efficacement protégés contre le SBV jusque l'âge de six mois grâce à l'immunité conférée par les anticorps colostraux (Elbers et al., 2014). Chez les ovins, des anticorps neutralisants ont été détectés plus de deux ans après le premier épisode d'infection virale tandis que la durée de l'immunité colostrale est estimée égale à quatre mois (Claine et

al., 2014). Poskin et al. (2014) ont également démontré chez l'ovine infectée de manière expérimentale par le SBV la persistance d'anticorps neutralisants durant au moins 15 mois.

Enfin, à côté des mesures précitées, des modifications de la régulation de troupeau pourraient être implémentées afin de réduire le risque de contamination par le SBV durant des périodes considérées comme des « fenêtres d'activité vectorielle ». A titre d'exemple, le décalage des saisons de lutte (ou saisons de mise à la reproduction) des petits ruminants ou l'évitement de la mise en pâture des jeunes individus naïfs pendant la période d'activité vectorielle ont été cités (Collins et al., 2019). Des mesures qui pourraient paraître illusoire dans un secteur d'élevage dont la physiologie de la reproduction est empreinte de saisonnalité mais au sein duquel l'emploi en lignée pure ou en croisement de races connues pour leur capacité de lutte en contre-saison est potentiellement applicable.

A.8 Impacts sur la santé et la productivité des troupeaux

L'épidémie de SBV en Europe est considérée comme un événement sanitaire majeur (Martinelle et al., 2014) mais son impact est décrit comme faible ou limité (Doceul et al., 2013). Il semble cependant difficile d'estimer réellement celui-ci sur le cheptel européen : le nombre de troupeaux infectés par le virus n'ayant pas été officiellement déclarés est en effet considéré important (Martinelle et al., 2014 ; Saegerman et al., 2014). Doceul et al. (2013) précise ainsi que la proportion de troupeaux confirmés infectés par le SBV par rapport au nombre total de troupeaux recensés par région est de 6,6 % pour les ovins et de 4,0 % pour les bovins sur le territoire belge.

A contrario, à l'échelle d'une exploitation, l'impact de l'infection par le SBV reste très variable (Dominguez et al., 2012). Cette hétérogénéité est directement liée à l'organisation des périodes de vêlages et/ou d'agnelages sur l'année (EFSA, 2014). A cet égard, les troupeaux ovins se révèlent plus sensibles à l'infection que les troupeaux bovins : la saisonnalité de leur

reproduction et la concordance de leur période de lutte avec la période d'activité vectorielle jouent clairement en leur défaveur (Afonso et al., 2014). Au sein des élevages de moutons menant plusieurs périodes de lutte annuelles, les pourcentages d'individus mort-nés et/ou de nouveau-nés présentant les caractéristiques cliniques d'une infection par le SBV sont extrêmement fluctuants entre campagnes d'agnelages. Ces observations sont liées au fait que les brebis ont été infectées par le SBV à des stades différents de leur vie productive (Afonso et al., 2014 ; Roberts et al., 2014). Les périodes de lutte coïncidant avec une fenêtre d'activité vectorielle élevée peuvent ainsi être considérées comme des périodes à risque (EFSA, 2014 ; Luttikholt et al., 2014). Aux Pays-Bas, une étude cas-témoin a été menée dans le but de décrire l'effet de l'infection par le SBV sur les performances de reproduction et sur le taux de mortalité chez les ovins. Il semble que cet impact était réel mais limité (Luttikholt et al., 2014). En France (Dominguez et al., 2014), au Royaume-Uni (Stokes et al., 2018) et en Irlande (Barrett et al., 2015), des études ont démontré une augmentation de la mortalité en péripartum et de la fréquence des dystocies ainsi qu'une diminution de la prolificité et du taux de sevrage dans les troupeaux infectés par le SBV.

Chez les bovins laitiers, une étude menée aux Pays-Bas et dans le district de Clèves (Allemagne) a tenté d'évaluer l'impact de l'épidémie de SBV de 2011 sur la production laitière, les performances de reproduction et la mortalité. Aucun impact n'a été mis en évidence sur la production de lait et sur les taux de mortalité des veaux, et seule une petite diminution du taux de fécondité a été observée indiquant le l'impact limité du SBV sur la productivité des bovins laitiers (Veldhuis et al., 2014).

Même s'il semble clair que l'impact du SBV sur la santé des ruminants et leur productivité s'est révélé limité à l'échelle du troupeau, l'influence de l'épidémie sur les marchés est toute autre. En effet, les restrictions imposées par les gouvernements sur les importations d'animaux, de semence et de produits destinés à l'industrie agro-alimentaire en provenance de

pays déclarés infectés par le SBV ont un impact économique important. A titre d'exemple, le nombre de doses de semence de bovins exportées par l'Europe s'est effondré de près de 25% en 2012 (EFSA, 2014).

Enfin, Harris et al. (2014) ont fait état dans leur étude de l'impact émotionnel de l'infection sur les éleveurs confrontés à l'émergence d'une pathologie dans leur troupeau et à la vue de nouveau-nés malformés.

B. Typologie du secteur ovin en Belgique

En Belgique, le secteur des petits ruminants rassemble les spéculations ovines et caprines. Ce secteur d'élevage fait exception dans le panorama agricole tant il se distingue par son hétérogénéité. En effet, si les secteurs bovins, porcins et avicoles concentrent des éleveurs professionnels, celui des moutons et chèvres comprend tant des détenteurs particuliers, que des éleveurs hobbyistes dont l'activité d'élevage est qualifiée de complémentaire mais aussi des agriculteurs professionnels à la tête de troupeaux de plusieurs centaines de têtes.

En ce qui concerne plus précisément le secteur ovin sur le territoire de la Région Wallonne (RW), il s'avère que le nombre de troupeaux recensés sur base des données collectées annuellement par l'Association Régionale de Santé et d'Identification Animales (ARSIA) dans le cadre de l'envoi des recensements hivernaux atteint les 7.892 troupeaux en 2021. Un nombre qui, comme l'illustre la **figure 5**, est en augmentation constante depuis plusieurs années traduisant ainsi l'attrait toujours plus important des particuliers pour le petit élevage comme de citoyens en quête de reconversion professionnelle ou encore d'agriculteurs dont le souhait est de diversifier leurs activités. A titre d'information, étaient dénombrés au mois de décembre 2021 sur le territoire de la RW un total de 7.892 troupeaux ovins, 3.450 troupeaux caprins et 9.430 troupeaux bovins (ARSIA, 2021).

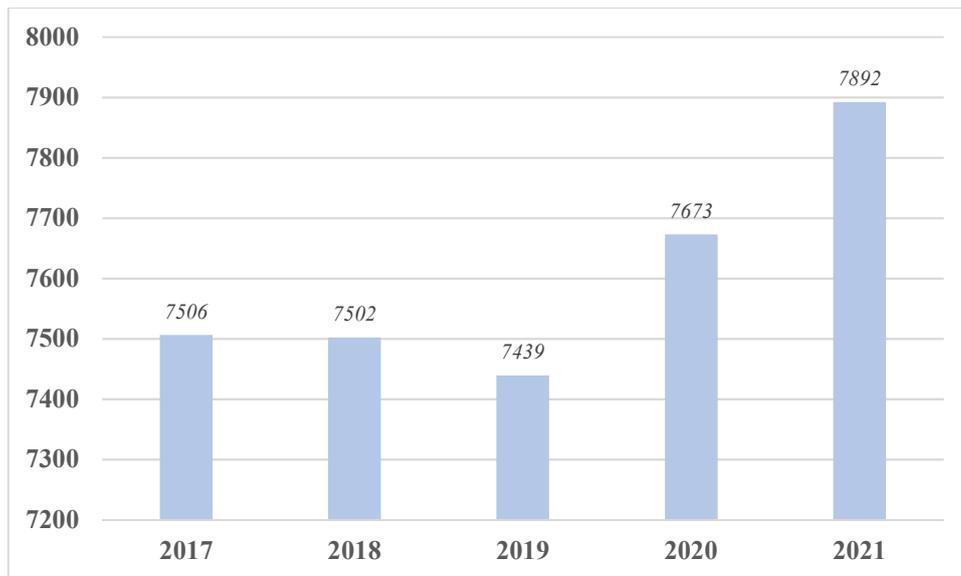


Figure 5 : Evolution du nombre de troupeaux ovins recensés sur le territoire de la Région Wallonne entre l'année 2017 et l'année 2021 (d'après ARSIA, 2021)

Quelques éléments remarquables sont encore à énoncer dans cette approche typologique du secteur ovin car ils permettent de le distinguer très clairement des autres secteurs d'élevage et revêtent un intérêt dans la démarche abordée dans ce travail : le nombre médian de femelles âgées de plus de 6 mois par troupeau est égal à 5 (min. 1 – max. 1.233) et 79% des troupeaux wallons sont constitués de 1 à 10 individus (**figure 6**), moins de 3% des élevages ovins wallons sont considérés comme des élevages professionnels c'est-à-dire capables de générer un revenu indépendamment de toute autre activité et, enfin, plus de la moitié des détenteurs de troupeaux ovins sont des particuliers ne disposant d'aucune connaissance particulière dans la conduite d'élevage et les risques sanitaires inhérents.

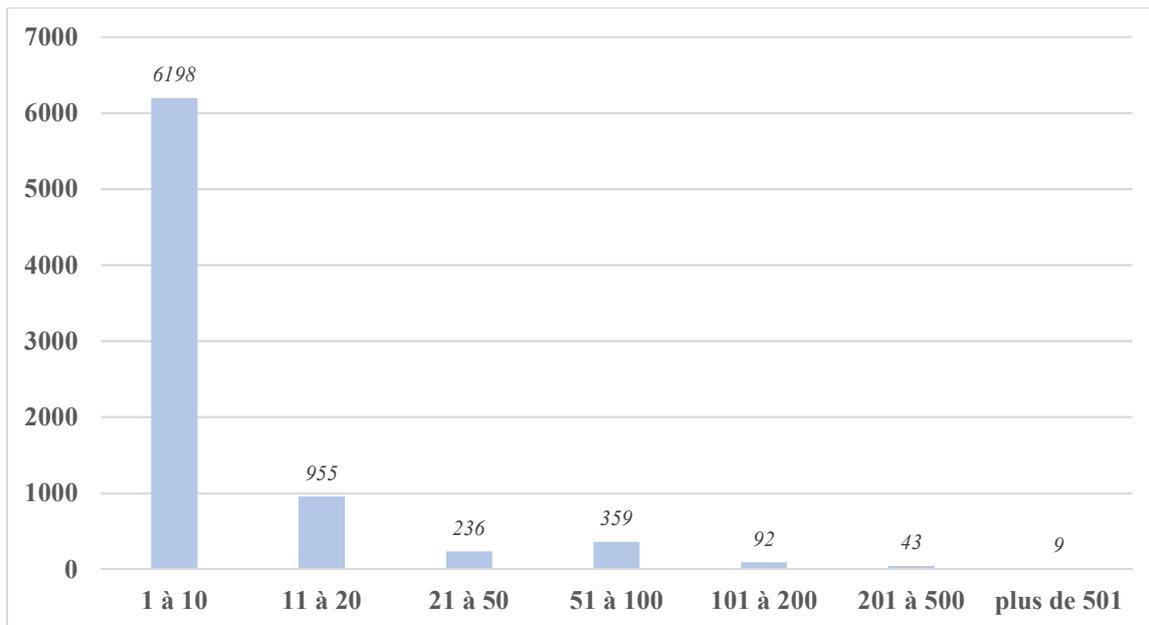


Figure 6 : Répartition des troupeaux ovins wallons par catégorie de taille selon le nombre d'individus femelles déclarés en 2021 (d'après ARSIA, 2021)

C. Considérations à propos de l'état et du suivi sanitaires des troupeaux ovins

Une fois de plus le secteur ovin fait ici figure d'exception, et ce à plusieurs égards. A l'inverse des troupeaux bovins pour lesquels nombreuses exigences de traçabilité et de santé liées à leur conduite sont transcrites dans des arrêtés royaux, les détenteurs ovins sont soumis à l'échelon fédéral à peu de contraintes. Peuvent ainsi être citées à titre d'exemple l'absence de désignation d'un vétérinaire d'épidémiosurveillance, l'inexistence de plans de lutte sanitaire à caractère obligatoire, l'absence de traçabilité des mouvements entre troupeaux. En outre, les seules initiatives fédérales déployées à des fins d'appui diagnostic et de surveillance pour la collectivité, à l'instar du protocole avortement, bénéficient d'un très faible taux de participation du secteur alors que l'ensemble des analyses opérées dans son cadre sont financées par l'Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire (AFSCA) et le Fonds de Santé Ovins-Caprins. L'ARSIA estime ainsi que seuls 2% des avortons et agneaux mort-nés de moins de 48h font l'objet d'une déclaration officielle dans le cadre de ce protocole avortement.

En outre, la maîtrise du risque sanitaire et des éléments dits de biosécurité externe et interne n'est pas matière approchée de longue date dans ce secteur. Ce n'est ainsi que très récemment que plusieurs initiatives ont vu le jour en RW afin d'assurer un meilleur suivi sanitaire des troupeaux ovins à l'image du « Kit Introduction Ovins-Caprins » lancé au mois d'avril 2021 par l'ARSIA.

D. Objectifs du travail

L'objectif primaire poursuivi au fil de cette thèse est, bien entendu, d'apporter une contribution aux connaissances relatives au SBV et, plus précisément, quant aux répercussions anatomo-pathologiques, virologiques et sérologiques de son infection naturelle dans l'espèce ovine. L'ensemble des données collectées auprès du troupeau du Centre de Recherches Ovines (CRO) de l'Université de Namur (UNamur) sur une période de 5 années sera donc utilisé à cet égard.

Dans le but d'assurer une description chronologique des événements épidémiologiques connus au CRO et d'en faciliter la lecture, les études relatées dans ce présent document ne seront donc pas positionnées dans leur ordre de publication. Une redistribution des résultats obtenus a ainsi été volontairement opérée afin de respecter leur fenêtre temporelle d'observation, conduisant ainsi à la description des épisodes suivants : l'émergence du SBV, la phase de réexpression, la période de latence et la phase de résurgence virale.

Pour chacun de ces épisodes successifs, les objectifs secondaires seront (1) d'en assurer la traduction anatomique, virologique et/ou sérologique à hauteur d'individu et/ou du troupeau ovine du CRO et (2) de discuter de l'intérêt et des limites des méthodes déployées à hauteur d'un élevage mais également de la collectivité.

Partant de l'image individuelle et aboutissant à sa résonance collective, cette thèse tentera donc de définir les impacts de l'infection naturelle au SBV dans l'espèce ovine en offrant une image pouvant être qualifiée de globale et ouvrant le champ de la réflexion quant à la dynamique de gestion de la santé ovine, et plus précisément, des phénomènes abortifs.

CHAPITRE I : Matériel & Méthodes

Afin de faciliter la lecture et la compréhension de ce travail, seuls seront détaillés dans ce chapitre des éléments dits généraux, à savoir le contexte d'élevage dans lequel s'inscrivent les études menées et les deux principales techniques diagnostiques employées. Des précisions seront ultérieurement apportées tant au sujet de la population animale suivie que des méthodes spécifiquement déployées dans le cadre de la description des différentes investigations opérées.

A. Matériel

A.1 Généralités

Le troupeau ovin ayant fait l'objet d'un suivi dans le cadre du présent travail est hébergé au CRO dépendant de l'UNamur. Situé à 17 km au Sud-Est de la ville de Namur sur la commune de Gesves, le CRO dispose d'un ensemble de bâtiments d'élevage et de prairies répartis sur près de 60 hectares en plein cœur de la vallée du Samson.

Le nombre de têtes y avoisine les 400 brebis allaitantes majoritairement de races Ile de France et Texel, élevées en lignées pures et croisées. Les périodes d'agnelages sont classiquement réparties en cinq campagnes annuelles (janvier, mars, mai, octobre et novembre) profitant ainsi des luttés saisonnières et dessaisonnées. Une quinzaine de béliers y sont également hébergés.

Le CRO remplit trois missions essentielles qu'il est important de citer tant celles-ci ont un impact direct sur la conduite du dit troupeau comme sur les possibilités logistiques d'intervention au sein de ce dernier : l'enseignement aux étudiants en sciences vétérinaires et biologiques, la recherche en santé ovine et le service aux éleveurs du secteur. Ainsi, contrairement à d'autres entreprises ovines de taille équivalente, le nombre de personnes susceptibles d'œuvrer au sein même du CRO est éminemment supérieur et les membres du staff

(techniciens, vétérinaires encadrants) rompus à l'exercice de la surveillance du troupeau comme à celle de la réalisation de prélèvements biologiques. En outre, la volonté affichée du CRO de se présenter comme une vitrine du et pour le secteur ovin l'amène à se positionner comme un des leaders wallons en matière de suivi sanitaire et de surveillance des maladies.

C'est dans ce contexte que le troupeau du CRO a servi de modèle d'étude de l'émergence et des impacts du virus de la fièvre catarrhale ovine en 2008 (Kirschvink et al., 2009 ; Saegerman et al., 2011).

A.2 Eléments de régie de troupeau en peripartum

La conduite des brebis en fin de gestation comme des brebis venant d'agneler doit être précisée dans un but de mise en lumière des facilités logistiques offertes.

En fin de gestation, les brebis sont maintenues en bergerie dans une stabulation munie d'un couloir de service en périphérie facilitant la surveillance des animaux. Les membres du staff du CRO, accompagnés par les étudiants en sciences vétérinaires durant les périodes d'agnelages, assurent une observation régulière du lot en journée et durant la nuit. Tout signe annonciateur de mise-bas entraîne l'intervention d'un membre du personnel afin d'assister l'agnelage (contrôle de la position et de la présentation de l'agneau, aide à la délivrance, assistance au démarrage de l'agneau, ...). Les brebis venant d'agneler et leur portée sont dès mise-bas conduites dans la zone de maternité, contiguë à leur loge. Y sont aménagées des cases d'agnelages dans laquelle la mère et son / ses jeune(s) sont logés durant au moins 48 heures avant regroupement. Le maintien des couples mère-jeunes en cases d'agnelages durant les premières heures du *post-partum* facilite bien entendu le développement du lien maternel mais aussi le contrôle de la présence du colostrum et des premières tétées comme la réalisation de prélèvements divers (prises de sang, collecte de colostrum, pesée de l'agneau, ...). La réalisation d'autopsies à des fins d'identification des lésions anatomo-pathologiques

rencontrées en périnatalité est également possible sur site : le CRO dispose en effet d'un local et de matériel à cette intention.

Enfin, et c'est un élément d'importance dans les circonstances ici décrites, le staff est rompu à l'exercice de l'utilisation des carnets et fiches d'agnelages, à savoir des documents sur lesquels est consignée variété d'informations sur la brebis et sa portée (identification, évaluations pondérales, trouble(s) sanitaire(s) rencontré(s), ...).

A.3 Population suivie

Dans le cadre de ce travail, l'ensemble des animaux issus du troupeau du CRO a été suivi. Des fluctuations du nombre d'individus dans les échantillonnages réalisés sont observées en raison des mouvements (achat, vente, renouvellement, réforme, naissance) au sein du troupeau mais également selon les objectifs des différentes investigations menées. Ainsi, des précisions seront apportées étude après étude afin de clarifier ce point.

B. Méthodes

B.1 Prélèvements biologiques

a) Sang

Les prélèvements sanguins ont été opérés dans la veine jugulaire gauche ou droite de l'animal dont la contention est assurée par un aidant. Un dispositif de type Vacutainer a été employé avec des tubes collecteurs de type sec disposant d'un volume nominal de 3 ml (agneaux) ou de 9 ml (ovins adultes). Le sang a ensuite été centrifugé afin d'en récolter le sérum, lui-même conservé à -20°C.

b) Colostrum

Le colostrum a été collecté immédiatement après la mise-bas via une traite manuelle de la brebis, une fois celle-ci placée en case d'agnelage. Il est stocké à -20°C.

B.2 Test de neutralisation virale (VNT)

a) Culture cellulaire

Des cellules rénales de hamster ou Baby Hamster Kidney (BHK21) ont été choisies pour la mise en œuvre de cette culture de type adhérente dans un milieu Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM) complété en tryptose phosphate, pénicilline-streptomycine et sérum fœtal bovin (FBS).

b) Isolat viral

L'isolat viral SBV-BH80/11-4, transmis par le FLI (Allemagne), est la souche employée pour la réalisation des tests de neutralisation virale. Elle a été conservée en suspension dans des aliquots de 500 µl et titre à $6,77 \times 10^6$ Total Count Infectious Dosis 50 (TCID50).

c) Dilution des sera et expression des résultats

Après inactivation thermique, les échantillons de sérum ont été dilués en double dans du Minimum Essential Medium (MEM) à douze reprises à partir de la dilution 1/2 dans des plaques 96 puits. Ce sont approximativement 100 à 200 TCID50 de l'isolat viral qui ont été alors ajoutés à chaque dilution sérique avant incubation à 37°C.

Les résultats des tests de neutralisation virale sont exprimés en dilution efficace 50 (ED50) à savoir la dilution sérique entraînant 50% de neutralisation virale. Les résultats sont considérés comme positifs si et seulement si la valeur logarithmique en base deux de la ED50 (\log_2 ED50) est supérieure à 3,49.

B.3 Réaction en chaîne quantitative par polymérase en temps réel (RT-qPCR)

La RT-qPCR utilisée dans le cadre de ce travail est celle développée par le FLI (Hoffmann et al., 2012) et réalisée à partir de l'ARN extrait de chaque échantillon de sérum

(QIAmp® viral RNA mini kit (250)) et conservé à -80°C . Les résultats sont exprimés en cycles de thermocycleurs (Ct) et considérés positifs dès lors que la valeur de Ct < 40 .

B.4 Projets éthiques

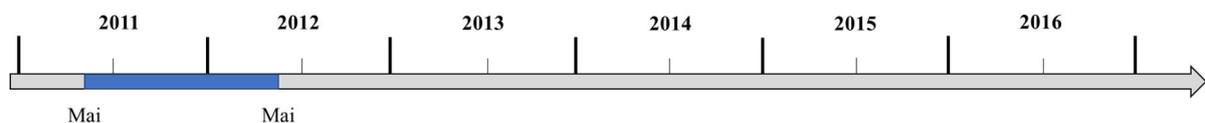
Les actes de contention, de manipulation et de prélèvement réalisés auprès des ovins issus du troupeau du CRO ont tous été validés par la Commission d'éthique en expérimentation animale de l'UNamur et consignés dans les dossiers 12-185 KI et 13-192 KI.

CHAPITRE II : Episode premier ou phase d'émergence virale

Ce chapitre décrit et commente le premier épisode de l'infection naturelle au SBV connu dans le troupeau ovin du CRO à savoir la phase dite d'émergence virale. Les données ici présentées cherchent à répondre aux objectifs suivants :

- ✓ *Quelles sont les lésions anatomo-pathologiques et histo-pathologiques observées au cours de ladite phase et auprès de quelle(s) catégorie(s) d'âge celles-ci ont-elles été décelées ?*
- ✓ *Quel lien peut-il être établi entre les lésions observées et l'infection au SBV ?*
- ✓ *Quel est l'impact du phénomène d'émergence virale sur la séroprévalence intra-troupeau ?*
- ✓ *Sur base des informations précédemment collectées, dans quelle fenêtre temporelle le SBV a-t-il circulé au sein du troupeau du CRO ?*
- ✓ *Enfin, quel est l'impact zootechnique de cette phase d'émergence du SBV sur les paramètres dits de reproduction à hauteur du troupeau ?*

Chronologiquement, les investigations décrites dans ce chapitre se sont étalées au long de la période représentée sur la frise suivante :



Les résultats mentionnés dans ce chapitre ont été cités dans les ressources listées ci-dessous :

- ❖ Kirschvink N, Claine F, Wiggers L, Muylkens B. Natural infection of a sheep flock with Schmallenberg virus: clinical, serological and virological features. EPIZONE Congress, Brighton, 2012 (poster)
- ❖ Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Evidence and time-course of spreading Schmallenberg virus in late summer 2011 in a Belgian naïve sheep flock. EPIZONE Congress, Brussels, 2013 (oral presentation)
- ❖ Boseret G, Claine F, Coupeau D, Muylkens B, Saegerman C, Chantraine F, Kirschvink N. In utero infection by Schmallenberg virus induces arthrogryposis multiplex congenita in ovine fetuses. Multidisciplinary Gynecology Congress, Paris, 2014 (poster)
- ❖ Claine F, Wiggers L, Coupeau D, Muylkens B, Kirschvink N. Evolution of Schmallenberg virus seropositivity over years among sheep naturally infected at different ages. EPIZONE Congress, Montpellier, 2015 (oral presentation)
- ❖ Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Schmallenberg virus infection of ruminants: challenges and opportunities for veterinarians. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. 2015;6:261-272

A. Approche descriptive des manifestations lésionnelles rencontrées

C'est au cours de la campagne d'agnelages du mois de janvier 2012 que les premiers cas d'agneaux mort-nés ou nouveau-nés présentant des malformations congénitales compatibles avec celles décrites en cas d'infection transplacentaire au SBV ont été recensés. Il s'agissait de déformations des membres antérieurs et/ou postérieurs, de la colonne vertébrale et de désordres nerveux regroupables sous le terme de syndrome AG-HE. Au cours des campagnes d'agnelages suivantes, le tableau lésionnel a éminemment évolué : seuls des avortements en fin de gestation sans malformation remarquable ont été constatés au mois de mars 2012, tandis qu'aucun avortement et/ou anomalie développementale n'a été observé au mois de mai 2012. Dès lors, les considérations anatomo-pathologiques et histo-pathologiques ci abordées se concentrent sur la période d'agnelages du mois de janvier 2012 tel que décrit sur la **figure 7** ci-dessous.

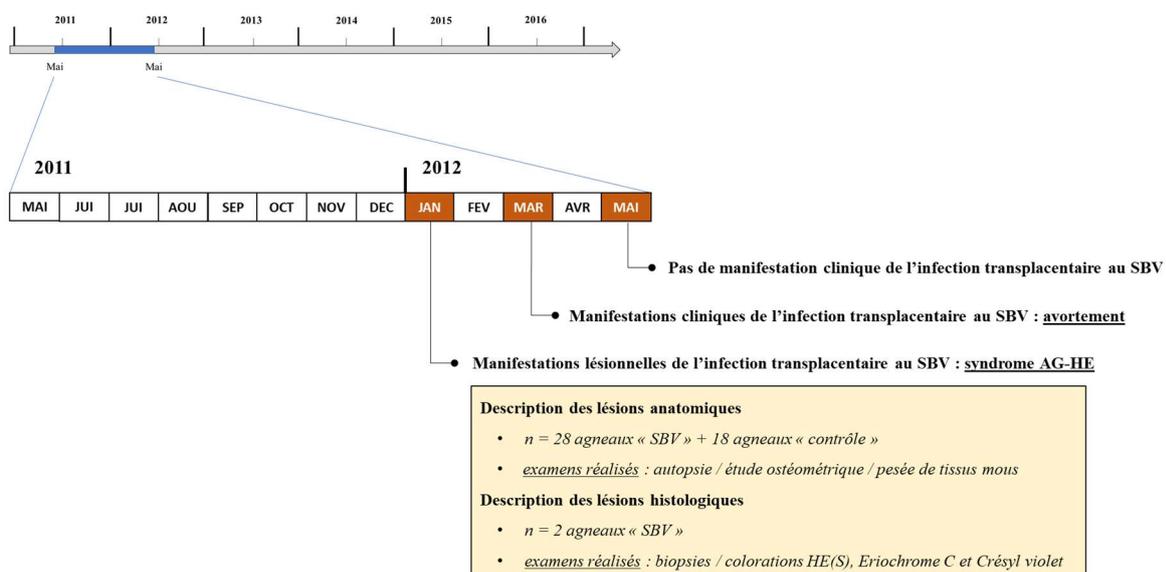


Figure 7 : Description synthétique de la méthodologie déployée dans le cadre de l'approche descriptive des manifestations lésionnelles rencontrées suite à l'émergence du SBV dans le troupeau du CRO

A.1 Considérations anatomo-pathologiques

Au cours de la période d'agnelages du mois de janvier 2012, un nombre total de 99 brebis a mis au monde 163 agneaux. Parmi ceux-ci, 28 mort-nés ou nouveau-nés ont présenté une ou plusieurs des malformations susmentionnées. Le premier cas a été recensé en date du 7 janvier 2012. Ces agneaux, à ce stade suspects d'infection transplacentaire par le SBV, sont nés de 23 brebis différentes, et ce parfois au sein d'une portée dont les autres membres ne présentaient aucune affection. Onze jumeaux cliniquement sains ont ainsi été dénombrés. Si aucun effet de la parité de la brebis sur l'observation des lésions caractéristiques chez l'agneau n'a été constaté, il est à noter que, parmi les 28 agneaux évoqués, le ratio mâle : femelle est de 21 :7.

L'autopsie des agneaux SBV, réalisée dans les 24h suivant la mise-bas, a permis d'entreprendre une description précise du tableau lésionnel, et ce plus particulièrement des atteintes développementales du système nerveux central grâce à l'ouverture systématique de la boîte crânienne. Les lésions constatées au niveau du système nerveux central sont l'aplasie ou l'hypoplasie des tissus suivants : cerveau, cervelet, moelle épinière (**figure 8A**). De l'hydranencéphalie et de l'hydrocéphalie ont été également notées. Quant aux déviations anatomiques observées au niveau des membres et de la colonne vertébrale, 5 types différents ont été relevés : l'arthrogrypose, le torticolis, la scoliose, la cyphose et la lordose. De manière plus précise, l'arthrogrypose a été constatée sur l'ensemble des 28 agneaux concernés (**figure 8B**). Les déviations anatomiques ont été observées à hauteur d'un grand nombre d'articulations (épaule, coude, carpe, grasset et jarret) et majoritairement caractérisées par une réduction de l'angle formé par les structures osseuses bordant l'articulation, autrement dit une flexion. Cette observation a été réalisée pour chacune des articulations mentionnées plus haut.

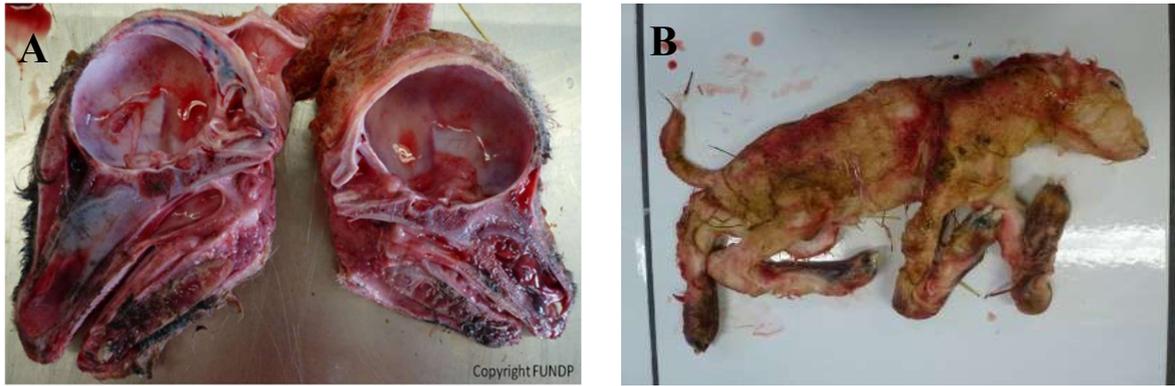


Figure 8 : Malformations congénitales observées auprès d'agneaux ayant subi une infection transplacentaire au SBV telles l'aplasie cérébrale et cérébelleuse (A) et l'arthrogrypose (B) (© UNamur)

Afin de compléter cette nécropsie, une étude ostéométrique approfondie a été réalisée. Celle-ci a concerné 21 des 28 agneaux SBV et 18 agneaux sains nouveau-nés utilisés comme individus contrôles. Ces derniers ont été enregistrés comme « pertes en *peripartum* » non associées à l'infection transplacentaire au SBV dans la mesure où elles n'ont pas été marquées par l'observation de quelque malformation congénitale. L'étude ostéométrique s'est intéressée aux mesures suivantes : la longueur de la mandibule au foramen mentonnier et la longueur condylo-basale supérieure ainsi que la longueur de la diaphyse et les largeurs des épiphyses proximales et distales des os longs des membres antérieurs et postérieurs (**figure 9**).

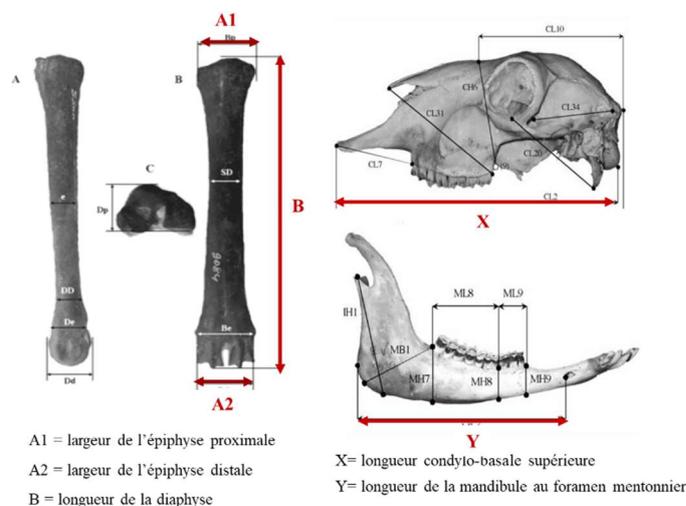


Figure 9 : Mesures réalisées au niveau des os longs, des os du crâne et de la mandibule dans le cadre de l'étude ostéométrique

Il est apparu, auprès de la population d'agneaux SBV, une nette brachygnathie inférieure de même qu'un ratio largeur épiphysaire/longueur diaphysaire significativement plus faible ($p < 0,05$), tel qu'illustré sur le **tableau 3** ci-dessous, traduisant des processus anormaux de développement de ces structures osseuses.

Tableau 3 : Comparaison des ratio « largeur épiphysaire/longueur diaphysaire » évalués auprès des agneaux SBV et des agneaux « Contrôle » dans le cadre de l'étude ostéométrique

Os	Ratio (A1/B or A2/B)		Agneaux SBV Moyenne \pm Ecart-type	Agneaux « Contrôle » Moyenne \pm Ecart-type
	A	B		
Humérus	A1	B	0,235 \pm 0,031 (n=40)	0,272 \pm 0,027 (*) (n=36)
	A2		0,270 \pm 0,024 (n=40)	0,302 \pm 0,021 (*) (n=36)
Radius	A1	B	0,235 \pm 0,022 (n=40)	0,273 \pm 0,021 (*) (n=36)
	A2		0,263 \pm 0,026 (n=40)	0,312 \pm 0,027 (*) (n=36)
Fémur	A1	B	0,245 \pm 0,025 (n=39)	0,309 \pm 0,027 (*) (n=36)
	A2		0,313 \pm 0,020 (n=39)	0,332 \pm 0,028 (*) (n=36)
Tibia	A1	B	0,260 \pm 0,023 (n=40)	0,299 \pm 0,029 (*) (n=36)
	A2		0,194 \pm 0,018 (n=40)	0,237 \pm 0,008 (*) (n=36)
Métacarpien principal	A1	B	0,158 \pm 0,018 (n=30)	0,190 \pm 0,024 (*) (n=36)
	A2		0,240 \pm 0,020 (n=30)	0,264 \pm 0,026 (*) (n=36)
Métatarsien principal	A1	B	0,185 \pm 0,017 (n=38)	0,216 \pm 0,028 (*) (n=36)
	A2		0,208 \pm 0,016 (n=38)	0,238 \pm 0,025 (*) (n=36)

A1 = largeur de l'épiphyse proximale

A2 = largeur de l'épiphyse distale

B = longueur de la diaphyse

(*) significativement différent ($p < 0,05$)

De manière complémentaire à cette approche, la réalisation de pesées sur un ensemble d'organes prélevés auprès des 28 agneaux SBV comparés aux agneaux « contrôle » a mis en évidence que les masses du tissu pulmonaire, de la langue et des thyroïdes étaient significativement réduites chez les agneaux SBV ainsi que la masse testiculaire auprès des individus de sexe mâle ($p < 0,05$). Ces individus mâles étaient d'ailleurs majoritairement cryptorchides (20/24). *A contrario*, le volume de la caillette et la masse des glandes surrénales ne présentaient aucune différence significative entre les deux groupes considérés ($p > 0,05$).

Enfin, au niveau du diaphragme, un tableau lésionnel varié a été observé évoluant entre fibrose, hypoplasie des piliers et de la bande charnue périphérique voire absence totale de cloisonnement entre la cage thoracique et la cavité abdominale.

Finalement, les 28 agneaux mort-nés ou nouveau-nés suspects d'infection transplacentaire au SBV ont été répartis en 4 profils selon leur état de survie à la mise-bas et le degré de sévérité du tableau lésionnel présenté. Ainsi, ont été comptabilisés dans un ordre d'incidence décroissant 65% (18/28) d'agneaux nés vivants mais succombant rapidement d'asphyxie, 14% (4/28) d'agneaux morts *in utero* et 14% d'agneaux nés vivants présentant des lésions locomotrices jugées sévères (déviations osseuses majeures, incapacité de mouvement), et, enfin, 7% (2/28) d'agneaux nés vivants présentant des lésions locomotrices jugées modérées (déviations osseuses, capacité de mouvement réduite). Tous les agnelages dont sont issus ces agneaux peuvent être qualifiés de dystociques et l'ensemble des brebis ayant donné naissance à un ou plusieurs agneaux SBV a dû être réformé voire euthanasié. Tel qu'indiqué sur le **tableau 4** ci-dessous, tous les agneaux, quel que soit leur profil, ont présenté de l'arthrogrypose. L'individu mort *in utero* présente le tableau lésionnel le plus sévère et le plus complet à savoir des déviations de la colonne vertébrale, de la brachygnathie inférieure et des lésions du SNC telles que précédemment décrites. Les individus nés vivants, quant à eux, se distinguent par un tableau lésionnel plus contrasté. Ainsi, comparativement à l'agneau mort *in utero*, l'agneau né vivant succombant d'asphyxie présente de la brachygnathie inférieure. Chez lui, les déviations de la colonne et les lésions du SNC sont inconstantes tant dans leur fréquence de présentation que dans leur sévérité. Enfin, chez l'agneau né vivant et au demeurant viable, l'arthrogrypose est l'unique caractéristique clinique rencontrée. La sévérité des désordres locomoteurs est corrélée à la présence de lésions du SNC. Il doit enfin être signalé qu'aucun des agneaux présentant exclusivement des désordres locomoteurs n'a été maintenu en vie. Leur euthanasie a été motivée par l'impossibilité d'assurer leur survie et leur conduite dans l'élevage.

Tableau 4 : Caractéristiques cliniques et lésionnelles des différents profils d’agneaux SBV nés courant la période d’agnelages de janvier 2012 (n=28)

Profils d’agneaux SBV	Incidence	Arthrogrypose	Déviations de la colonne	Brachygnathie inférieure	Lésions du SNC
Mort <i>in utero</i>	14% (4/28)	présente	présentes	présente	présentes
Né vivant mais mourant d’asphyxie	65% (18/28)	présente	inconstantes	présente	inconstantes
Né vivant avec de sévères lésions locomotrices	14% (4/28)	présente	absentes	rare	inconstantes
Né vivant avec des lésions locomotrices modérées	7% (2/28)	présente	absentes	absente	absentes

A.2 Considérations histo-pathologiques

Deux cadavres d’agneaux nés en janvier 2012 et présentant les lésions caractéristiques de l’infection transplacentaire au SBV ont fait l’objet de biopsies opérées au niveau des tissus suivants : muscles striés squelettiques des régions anatomiques concernées par l’arthrogrypose, cerveau, cervelet, tronc cérébral, moelle épinière. La conservation de ces prélèvements s’est faite dans du formol acétique avant examen histologique sous colorations Hemalun-Erythrosine-Safran (HES) pour les muscles striés squelettiques, Hemalun-Erythrosine (HE) pour les biopsies issues du système nerveux central complétée par l’Eriochrome C et le Crésyl violet.

Les observations réalisées peuvent être résumées comme suit :

- hypoplasie des fibres musculaires striées squelettiques et inclusions fibro-adipeuses en nombre (**figure 10A**)
- infiltrats lymphohistiocytaires périvasculaires, nodules gliaux et cavités au niveau du cerveau (**figure 10B**)
- infiltrats lymphohistiocytaires périvasculaires au niveau du cervelet (**figure 10C**)
- substance grise anormalement peu représentée au niveau de la moelle épinière d'où un ratio substance grise/substance blanche faible, nombre de neurones moteurs trop peu élevé dans les cornes ventrales, présence anormalement élevée de tissu conjonctif en face ventrale (**figure 10D**)

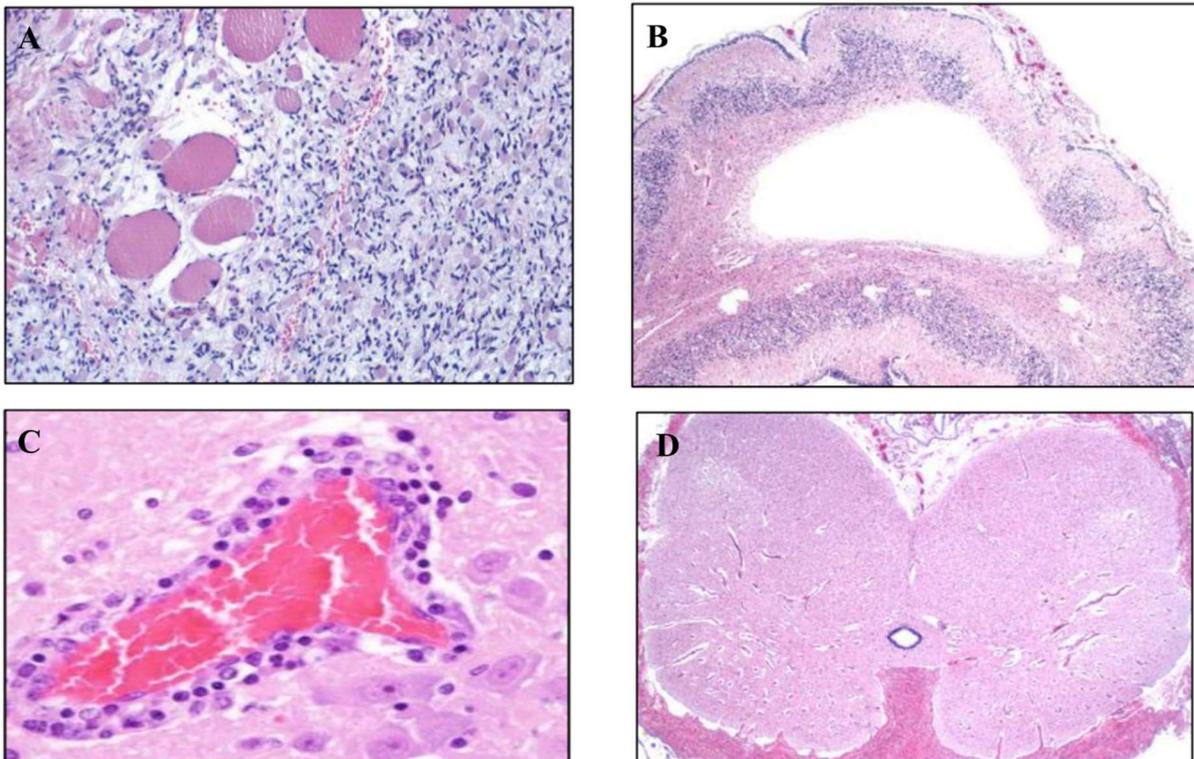


Figure 10 : Histopathologie des tissus musculaires et nerveux centraux prélevés sur des agneaux SBV (n=2) (A) hypoplasie du tissu musculaire strié squelettique (HE – x10), (B) infiltrats lymphohistiocytaires périvasculaires et nodules gliaux (Cerveau – HE – x1,25), (C) infiltrat lymphohistiocyttaire périvasculaire (Cervelet – HE – x40) et (D) hypoplasie des cornes ventrales (Moelle épinière – HE – x1,25)

B. Association des observations cliniques à l'infection transplacentaire au

SBV

B.1 Approche virologique

Lors de l'autopsie des 28 agneaux malformés nés au mois de janvier 2012, des biopsies de tissus nerveux centraux (cerveau, cervelet, tronc cérébral, moelle épinière, *selon leur état de développement*) ont été réalisées et conservées à une température de -80°C afin d'opérer dans les semaines suivantes un diagnostic virologique de l'atteinte par le SBV via RT-qPCR. Seuls 19 des 28 agneaux concernés ont pu faire l'objet de cette démarche diagnostique en raison de l'état de conservation de leurs tissus. Comme présenté sur le **tableau 5**, les résultats font apparaître que 58% des échantillons testés sont PCR positifs (11/19) avec une gamme de Ct oscillant entre 15,39 et 38,86, confirmant ainsi l'atteinte transplacentaire par le virus.

Tableau 5 : Résultats des tests RT-qPCR opérés sur des biopsies de SNC auprès des 28 agneaux SBV nés au cours de la période d'agnelages de janvier 2012. Ces résultats sont exprimés en valeur de Ct avec un seuil de positivité inférieur à 40,0.

RT-qPCR sur échantillons de SNC	
<i>Agneau</i>	<i>Valeur de Ct</i>
Agneau 1	33,77
Agneau 2	inhibition
Agneau 3	inhibition
Agneau 4	pas de valeur de Ct
Agneau 5	30,95
Agneau 6	23,72
Agneau 7	38,86
Agneau 8	pas de valeur de Ct
Agneau 9	pas de valeur de Ct
Agneau 10	31,29
Agneau 11	15,39
Agneau 12	40,32
Agneau 13	inhibition
Agneau 14	non testé
Agneau 15	non testé
Agneau 16	non testé
Agneau 17	non testé
Agneau 18	non testé
Agneau 19	non testé
Agneau 20	31,56
Agneau 21	non testé
Agneau 22	26,71
Agneau 23	pas de valeur de Ct
Agneau 24	28,04
Agneau 25	30,21
Agneau 26	non testé
Agneau 27	non testé
Agneau 28	32,06

Tel qu'évoqué plus haut, courant la campagne d'agnelages du mois de mars 2012, seuls 8 avortements en fin de gestation ont été constatés et ce exclusivement en début de période de naissances. Sur ces 8 animaux recensés, seuls deux agneaux ont présenté des résultats positifs dans le cadre de la réalisation du test RT-qPCR (Ct : 36,41 et 38,90) opéré sur les biopsies de cerveau.

B.2 Approche sérologique

Afin de mettre en évidence une réponse sérologique chez l'agneau né de mère infectée par le SBV, 4 populations d'agneaux nés courant du mois de janvier 2012 ont été utilisées : 9 agneaux SBV (population 1), 7 agneaux sains jumeaux d'agneaux SBV (population 2), 9 agneaux sains (population 3) et, enfin, 4 agneaux contrôles nés en 2017 (population 4). Le sang de ces agneaux a été collecté sur tube sec à la naissance avant ingestion de colostrum pour éviter toute interférence sérologique avec l'immunité maternelle. L'évaluation de la réponse sérologique est approchée selon deux épreuves diagnostiques différentes à savoir le VNT et l'ELISA.

Les résultats obtenus au travers des différentes techniques sérologiques démontrent un taux d'anticorps significativement plus élevé auprès des agneaux SBV comme l'illustre le **tableau 6**.

Tableau 6 : Valeurs de dilution médianes (min-max) menant à la neutralisation virale associées au % d'individus séropositifs et concentrations sériques en IgG ($\mu\text{g/ml}$) obtenues par ELISA.

	Agneaux SBV (n=9)	Agneaux sains jumeaux d'agneaux SBV (n=7)	Agneaux sains (n=9)	Agneaux « Contrôle » nés en 2017 (n=4)
SNT	128 (26-256)* 100% (9/9)	19 (0-128) 86% (6/7)	0 (0-9) 44% (4/9)	0 (0-0) 0% (0/4)
ELISA	758 (154-3069)*	186 (9-390)	14 (9-104)	36 (9-63)

(*) significativement différent des autres groupes ($p < 0,05$)

C. Evaluation de la séroprévalence intra-troupeau

Au mois de février 2012, au terme de la campagne d'agnelages ayant révélé l'image clinique quasi pathognomonique de l'infection transplacentaire au SBV confirmée par les analyses virologiques et sérologiques susmentionnées, une photographie sérologique du troupeau ovin du CRO a été réalisée dans le but d'évaluer la séroprévalence intra-troupeau.

Comme illustré sur la **figure 11**, une prise de sang a été opérée auprès de chaque ovin présent dans le troupeau du CRO au mois de février 2012. Le nombre total d'ovins prélevés est égal à 422 et comprend l'ensemble des animaux femelles en âge de lutte ainsi que les mâles reproducteurs. Les séra collectés ont fait l'objet d'un VNT.

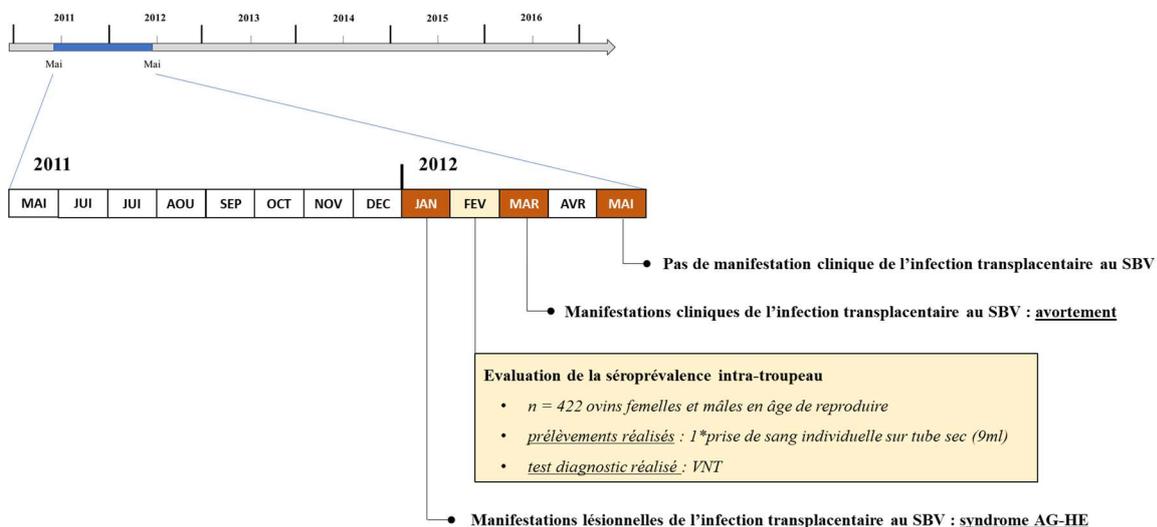


Figure 11 : Description synthétique de la méthodologie déployée dans l'évaluation de la séroprévalence intra-troupeau faisant suite à l'épisode d'émergence virale connu au CRO

Il ressort de cette analyse que 98,8% (417/422) des ovins testés disposent d'un statut sérologique positif au SBV.

D. Détermination rétrospective de la période d'émergence virale

Les observations anatomo-pathologiques opérées courant des campagnes d'agnelages de janvier, mars et mai 2012 font apparaître une image extrêmement hétérogène en termes de signalétique clinique et de prévalence lésionnelle. Ainsi, il semble clair que la fenêtre temporelle durant laquelle le SBV s'est introduit et a circulé au sein du troupeau du CRO a directement influencé les manifestations observées. A des fins de définition rétrospective de la période d'émergence virale, le protocole analytique suivant a été déployé et a généré les résultats mentionnés ci-dessous.

Tel que présenté sur la **figure 12**, deux populations ovines ont été employées. La première est composée de 63 brebis auprès desquelles des prises de sang ont été opérées aux dates suivantes : 10 mai 2011, 9 juin 2011, 27 juin 2011, 8 août 2011 et 6 septembre 2011. La seconde est constituée de 10 agneaux nés à la fin du mois d'octobre 2011 dont les prises de sang ont été effectuées 36h après ingestion du colostrum. Les prélèvements collectés ont fait l'objet d'un VNT et/ou d'une RT-qPCR.

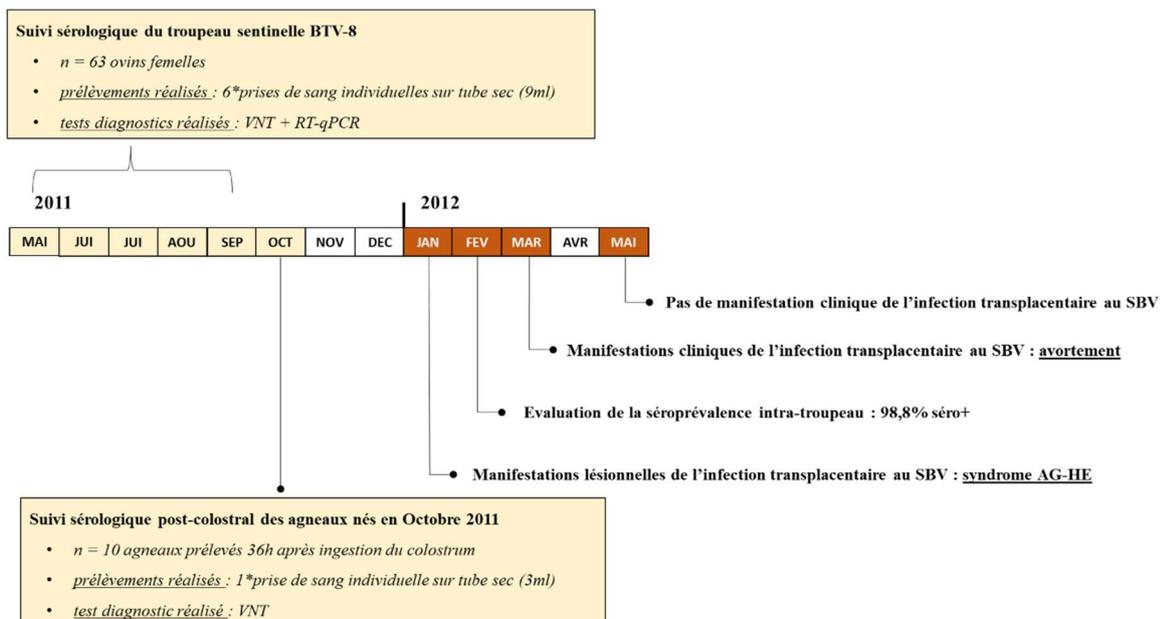


Figure 12 : Description synthétique de la méthodologie déployée dans la détermination rétrospective de la période d'émergence virale connue au CRO

A titre informatif, ces animaux avaient été historiquement prélevés dans le cadre du monitoring sérologique de la circulation du BTV au sein du CRO.

Les résultats des VNT font apparaître que la totalité (63/63) des brebis demeurent séronégatives entre le 10 mai et le 6 septembre 2011. Par contre, en date du 6 septembre, trois de ces animaux présentent un résultat positif au test RT-qPCR. Enfin, les agneaux nés fin du mois d'octobre 2011 disposent, après ingestion de colostrum de leurs brebis, tous d'anticorps dirigés contre le SBV.

Ces résultats sérologiques et virologiques suggèrent que la phase d'émergence virale s'est initiée au début du mois de septembre 2011. Considérant d'une part la fenêtre temporelle compatible avec l'observation de malformations congénitales chez le fœtus ovin en cas d'infection par AKAV (du 30^{ème} au 50^{ème} jours de gestation) et d'autre part le fait que les malformations congénitales ont été observées tout au long de la période d'agnelages de janvier 2012, il peut être déduit que les brebis dont la mise-bas a eu lieu en janvier (n=99) ont pu être infectées entre le 18 septembre (date de mise à la lutte + 30 jours) et le 26 octobre 2011 (date de sortie de lutte + 50 jours). Les brebis ayant agnelé fin octobre 2011 ont, quant à elles, très probablement connu l'infection autour de la mi-octobre au plus tard puisque leurs agneaux disposaient d'anticorps colostraux dirigés contre le SBV. La période d'émergence virale au CRO peut ainsi être fixée entre le début du mois de septembre 2011 et la fin du mois d'octobre 2011, comme illustré sur la **figure 13**.

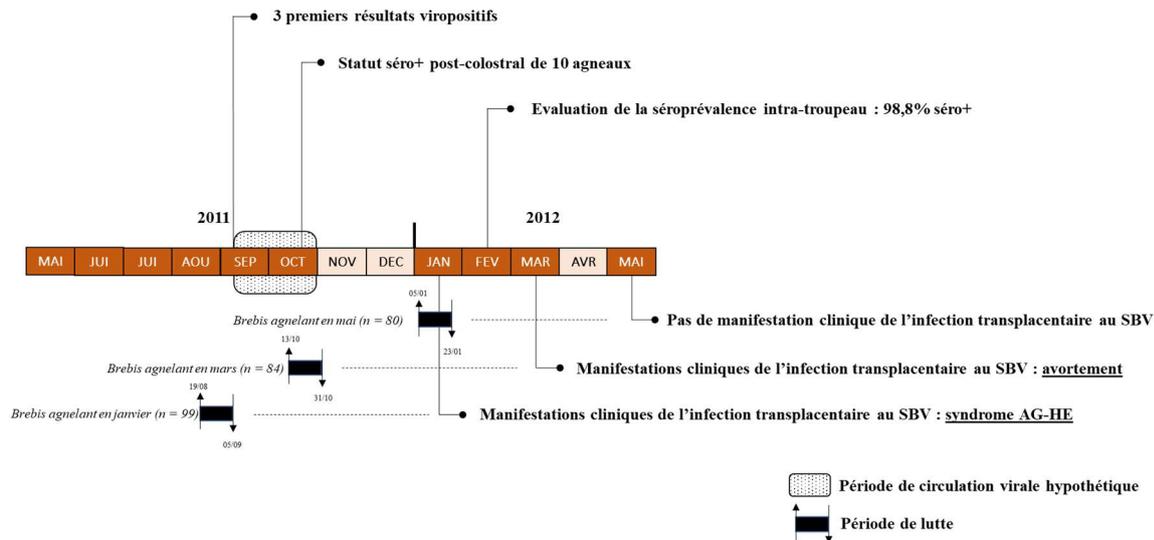


Figure 13 : Détermination de la période d'émergence du SBV au CRO et événements-clés déterminants et consécutifs à celle-ci

Durant cette période, les brebis ayant agnelé en mars (n=84) et en mai 2012 (n=80) étaient respectivement en tout début de gestation ou en phase de lutte, ce qui explique le très faible impact voire l'impact nul de l'infection par le SBV sur leur progéniture. Ainsi, au mois de mars 2012, seuls des avortements en fin de gestation ont été observés, et ce en début de campagne de naissances tandis qu'au mois de mai aucune manifestation clinique n'a été décelée.

E. Impact de l'émergence du SBV sur les paramètres de reproduction

Comme précisé ci-dessus, l'état physiologique des lots d'antennaises et de brebis au moment de la période de circulation virale a directement conditionné le tableau lésionnel relevé durant les campagnes d'agnelages de janvier, mars et mai 2012. *A contrario*, l'émergence du SBV au CRO n'a nullement impacté les paramètres de reproduction de ces mêmes lots. Ainsi, malgré l'observation de malformations congénitales sur 28 agneaux courant la saison de naissances du mois de janvier et le recensement de 8 avortements durant celle du mois de mars, les taux de prolificité (nombre d'agneaux nés / nombre de brebis gestantes) de ces deux

campagnes d'agnelages ne présentent aucune différence significative par rapport aux taux de prolificité évalués aux mêmes mois des années précédentes, comme l'illustre le **tableau 7** ($p>0,05$).

Tableau 7 : Taux de prolificité évalués pour les campagnes d'agnelages des mois de janvier, mars et mai 2012 et taux de prolificité évalués pour des campagnes antérieures à mêmes périodes

	Année 2012	Année -1	Année -2
Janvier	1,7 (163/99)	1,8 (222/124)	1,6 (257/158)
Mars	1,8 (150/84)	1,6 (187/121)	1,6 (185/118)
Mai	1,6 (126/80)	1,4 (85/61)	1,4 (75/54)

Enfin, si l'approche du taux de fertilité (nombre de brebis gestantes / nombre de brebis luttées) se révèle complexe au CRO tant les mouvements de brebis luttées entre lots mis au(x) bélier(s) sont fréquents, aucune variation d'envergure n'a été observée entre les campagnes d'agnelages historiques et celles marquées par les vagues de circulation du SBV.

F. Intérêts et limites des méthodes déployées

Les méthodes d'investigation et approches diagnostiques déployées dès recensement du premier agneau malformé au mois de janvier 2012 ont permis de dresser un tableau lésionnel macroscopique et microscopique complet ainsi que d'attester du lien intime existant entre les observations effectuées et l'infection transplacentaire au SBV. La mise en œuvre d'une telle approche, tant multidisciplinaire que transversale, est inédite à hauteur du secteur ovin wallon tant elle suppose la disposition d'une équipe de gestionnaires et d'un plateau technique conséquents. Tels main d'œuvre et équipements ne sont rencontrés à hauteur d'aucun élevage « conventionnel », ce y compris au sein des structures qualifiées de professionnelles. En outre, comme mentionné précédemment, le secteur ovin wallon, et belge dans une plus grande mesure, est peu rompu à l'exercice de la démarche diagnostique et à la participation aux initiatives fédérales en matière d'identification des causes abortives. Dans ce contexte, le CRO dépendant de l'UNamur fait figure de pilier de la surveillance syndromique et, au travers des méthodes déployées, accroît la spécificité de l'approche diagnostique, en levant toute confusion quant à l'implication d'une autre entité virale, à l'instar du BTV, sur l'image clinique et le tableau lésionnel rencontrés.

Les méthodes déployées dans le cadre de la phase d'émergence virale relèvent ainsi, et avant toute autre chose, d'un intérêt collectif tant pour le secteur ovin que pour la communauté scientifique. La description des lésions anatomo-pathologiques types et la démonstration de leur association avec l'infection transplacentaire au SBV ont été suffisantes pour informer éleveurs et vétérinaires praticiens sur l'image attendue ou d'ores et déjà rencontrée dans les élevages. Au temps de l'émergence virale et des premières manifestations de l'infection sur le territoire national, aucune offre diagnostique commerciale n'existait. Ce n'était donc que l'exercice de la comparaison des faits qui se révélait susceptible d'orienter le couple éleveur-vétérinaire traitant vers l'agent responsable des désordres constatés.

L'approche ostéométrique et la description des lésions histo-pathologiques ont été, quant à elles, des investigations propres à compléter et confirmer les données compilées par la communauté scientifique sur le tropisme viral pour le système nerveux central et les anomalies développementales lui étant consécutives.

Comme mentionné ci-dessus, démontrer l'association des observations cliniques avec l'infection transplacentaire au SBV a augmenté la spécificité de l'approche, et ce d'autant plus au travers d'une épreuve diagnostique directe (RT-qPCR) qu'indirecte (VNT et ELISA). La démonstration de la présence de l'agent pathogène (portage) chez l'animal est, quelque soit la pathologie suspectée, d'une puissance diagnostique plus importante que la mise en évidence d'une confrontation historique du système immunitaire de l'animal à ce même agent pathogène. L'emploi de la technique de RT-qPCR sur les biopsies issues d'agneaux SBV a démontré les capacités du virus à traverser la barrière placentaire au cours de la gestation tandis que le diagnostic sérologique opéré sur sang prélevé avant ingestion du colostrum a souligné la réactivité du système immunitaire de l'agneau stade fœtal face au virus. La diversité des prélèvements issus d'agneaux SBV testés dans le cadre de l'épreuve diagnostique par RT-qPCR a permis d'identifier la pertinence de l'emploi de biopsies de cerveau, cervelet, tronc cérébral ou encore moelle épinière par rapport à d'autres tissus, certes plus facilement récupérables sur cadavre, mais dont l'usage se révèle moins sensible. Malheureusement, sur de nombreux agneaux SBV, l'état de dégradation tissulaire s'est traduit par une impossibilité de réaliser la RT-qPCR ou par une inhibition lors du test. Quant au recours à l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité de l'approche sérologique, et en particulier la technique ELISA, elle semble indispensable dans la mesure où elle représente un outil diagnostique rapide et meilleur marché. Malheureusement, il est apparu qu'elle présentait des divergences importantes et une sensibilité et une spécificité moindres que d'autres approches comme le VNT (Pejaković et al., 2018). Ainsi dans l'étude de Pejaković et al. (2018), les valeurs de spécificité et de sensibilité du VNT

sont toutes deux égales à 100%, lorsque les deux kits commerciaux ELISA atteignent respectivement 98% et 78% (IDEXX) contre 100% et 96% (ID.Vet). Si le VNT fait figure de *gold standard* dans l'approche sérologique, il ne peut cependant être considéré comme un outil diagnostique de routine dans un laboratoire de diagnostic de 1^{ère} ligne tant son utilisation est techniquement et logistiquement complexe.

Enfin, l'évaluation de la séroprévalence intra-troupeau en février 2012 et la détermination de la fenêtre temporelle de circulation virale quelques mois auparavant ont permis d'éclairer sur les capacités du virus à se propager au sein d'un cheptel et à engendrer une réponse immunitaire au sein de celui-ci. Ceci étant, cet élément d'informations ne renseigne aucunement sur l'efficacité de cette réponse et sa capacité à protéger le troupeau des conséquences d'un second épisode d'infection virale, élément d'intérêt à titre individuel comme collectif.

G. Discussion

Repositionnant les évènements dans leur ordre chronologique d'apparition, c'est donc à l'interface des saisons estivale et automnale de l'année 2011 que le SBV est apparu et a circulé au sein du troupeau du CRO. Durant cette fenêtre de temps, traditionnellement associée à la lutte saisonnière des ovins, l'infection s'est produite, entre autres, dans deux lots de brebis : l'un en fin de période de mise au bélier et l'autre en pleine phase de lutte. Si les ovins femelles de ces deux groupes étaient par définition immunitairement naïfs, l'émergence du SBV s'est traduite dans ces deux lots par un impact zootechnique fondamentalement distinct, et ce en raison du moment de l'infection par rapport à celui de la gestion à l'image des conclusions de Kirkland et al. (1988) réalisées dans le cadre de l'infection des ruminants femelles par AKAV. Comme mentionné par Bayrou et al. (2019), l'entrée en fonction des placentomes autour du 30^{ème} jour de gestation est vraisemblablement un élément promoteur de pathogénicité du SBV vis-à-vis de l'embryon ou du fœtus et l'atteinte de l'immunocompétence fœtale au début du second tiers de gestation un élément limitant. Dès lors, c'est au sein du lot de brebis agnelant au mois de janvier 2012 et clôturant sa période de lutte au moment de l'émergence du SBV que l'impact zootechnique s'est révélé le plus important : le virus a en effet circulé au sein d'un groupe de femelles dont certaines étaient d'ores et déjà gestantes. Ainsi, pas moins de 17% (28/163) des agneaux nés au mois de janvier 2012 ont présenté des malformations congénitales d'envergure. Comme précisé précédemment dans le cadre de la description de la pathogénie virale, la colonisation des placentomes fonctionnels par le SBV a permis l'invasion du fœtus ou des foeti avec un tropisme marqué pour les tissus nerveux centraux dont la traduction macroscopique a pu être appréciée et associée aux valeurs de Ct précitées. Aucun lien n'a cependant pu être établi entre la valeur de Ct obtenue en RT-qPCR et le moment de naissance de l'agneau au sein de la campagne d'agnelages de janvier 2012 et/ou le degré de sévérité des lésions observées. Dans le second lot, celui des brebis agnelant au mois de mars 2012 et en

pleine phase de lutte au moment de l'émergence, le virus n'a pu circuler qu'au sein de femelles soit non gestantes, soit dans les premiers jours de leur gestation. Ce sont seulement 8 avortons sur 150 produits nés qui ont été dénombrés durant la campagne d'agnelages de mars 2012, soit 5% des agneaux. Les pertes embryonnaires ici évoquées pourraient être associées avec l'hypoperfusion consécutive à la dégénérescence et la nécrose provoquée par la réplication du virus au niveau des cotylédons (Bayrou, 2019).

L'observation des malformations congénitales liées à l'infection transplacentaire et les euthanasies de brebis mères d'agneaux SBV dont les agnelages se révélaient inéluctablement dystociques ont conféré à cette phase d'émergence du SBV un caractère dramatique. Il n'empêche pas moins que son impact s'est montré extrêmement limité considérant le nombre de produits atteints. En outre, comme mentionné précédemment, aucun impact significatif de l'émergence du SBV n'a été constaté sur les paramètres de reproduction (taux de prolificité, taux de fertilité) au CRO. Ces éléments sont partagés par Afonso et al. (2014) précisant que les caractéristiques cliniques d'une infection par le SBV sont extrêmement fluctuantes entre campagnes d'agnelages et par Luttikholt et al. (2014) insistant sur le fait que l'impact du SBV reste limité sur les performances de reproduction et la mortalité dans les troupeaux ovins. La situation du secteur ovin face à l'émergence du SBV reste toutefois inédite à hauteur de l'élevage des ruminants domestiques dans la mesure où la saisonnalité de la reproduction des brebis et la concomitance de leur période de lutte et de la fenêtre de circulation virale les ont rendues particulièrement sensibles au SBV. Pour des éleveurs ovins ne réalisant qu'une campagne d'agnelages annuelle et ne travaillant pas en désaisonnement, l'incidence de l'infection par le SBV a pu se révéler catastrophique par rapport à d'autres élevages ovins pour lesquels les périodes d'agnelages sont étalées mais aussi comparativement à d'autres secteurs d'élevage comme celui des bovins.

Les malformations congénitales et le tableau lésionnel observés en cas d'infection transplacentaire par le SBV dans l'espèce ovine ont fait l'objet d'un nombre important de descriptions et d'études. Le caractère neurotrophe et cytopathogène du SBV est clair (Bayrou, 2019). Les désordres recensés au mois de janvier 2012 auprès des agneaux qualifiés d'agneaux « SBV » sont multiples et variés tant dans leur fréquence que dans leur intensité mais aussi dans le panel des tissus atteints. Si l'arthrogrypose est le signe commun à tout agneau SBV, la viabilité et les capacités de mouvement sont strictement associées à l'observation d'anomalies développementales du SNC comme illustré précédemment, ce qui est par ailleurs rencontré dans la majorité des cas (93% des agneaux SBV recensés au mois de janvier 2012). L'hypoplasie de la musculature striée squelettique est intimement liée à l'hypoplasie voire l'aplasie des tissus nerveux centraux et la combinaison des désordres musculaires et neurologiques responsable d'akinésie fœtale dont l'arthrogrypose constitue l'image macroscopique. L'étude ostéométrique proposée, dans sa comparaison du ratio largeur épiphysaire / longueur diaphysaire entre agneaux « SBV » et agneaux « Contrôle », a montré que ce ratio était significativement moindre chez les agneaux infectés traduisant l'impact de l'infection transplacentaire sur le processus de croissance osseuse. La réplication du SBV dans les ostéoblastes, sans être nécessairement cytopathique, pourrait compromettre un développement harmonieux de l'os dans sa longueur comme dans son épaisseur. Cette hypothèse a déjà été validée dans l'espèce ovine vis-à-vis d'autres entités virales à l'instar du virus de la maladie de Wesselsbron, flavivirus transmis par les moustiques et présent de manière endémique sur le continent africain (Oymans et al., 2020). Par ailleurs, il est pertinent de penser que l'akinésie fœtale puisse avoir un impact sur le développement articulaire du fœtus : les mouvements fœtaux actifs sont importants pour la formation et la croissance des articulations. Ils permettent une stimulation mécanique des articulations, ce qui est essentiel pour le développement et le remodelage normal des tissus articulaires, des muscles et des os.

Dans le cas d'un immobilisme foetal, des malformations articulaires et/ou une limitation de la mobilité articulaire sont à craindre

En outre, les désordres développementaux des tissus nerveux centraux supposent également une perturbation de la fonction endocrinienne et plus particulièrement celle de l'axe hypothalamo-hypophysaire, interface entre le SNC et le système endocrinien périphérique. L'aplasie ou l'hypoplasie des structures hypothalamique et hypophysaire ne peut qu'inéluctablement impacter le processus de développement foetal. Il est ainsi, à titre d'exemple, compréhensible que les agneaux « SBV » de sexe mâle soient majoritairement cryptorchides. Les hormones impliquées dans le phénomène de migration testiculaire à l'instar de l'hormone lutéinisante (LH) et de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) sont toutes deux produites par l'adénohypophyse en réponse à une stimulation hypothalamique d'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH).

Le partage du tableau lésionnel entre les cas d'infection transplacentaire au SBV et le syndrome d'arthrogrypose multiple congénitale (AMC) rencontré chez le fœtus humain est marquant. A côté de l'arthrogrypose, d'autres déformations sont également observées telle la scoliose ainsi que des anomalies développementales telles l'hydrocéphalie, la brachy- et micrognathie, l'hypoplasie pulmonaire, ... (Kowalczyk et al., 2016). En outre, l'atrophie des muscles masticateurs et linguaux décrite en médecine humaine chez les fœtus atteints d'AMC et l'altération du mécanisme de la déglutition inhérent sont considérés comme des éléments promoteurs d'hydramnios (Dimitraki et al., 2011). De manière comparable, et même si ce paramètre était difficilement évaluable et quantifiable, le volume de liquide amniotique a semblé plus important auprès de brebis mettant au monde des agneaux SBV qu'auprès de brebis mères d'agneaux cliniquement sains. L'atteinte développementale de la musculature striée squelettique, la brachygnathie et la masse linguale significativement réduite des agneaux SBV relevées pourraient être considérés chez l'ovine comme des facteurs d'altération de la déglutition

et par conséquent d'hydramnios, au même titre qu'en cas d'AMC chez le fœtus humain. Ceci étant, un élément distinctif doit être mentionné : l'AMC est rarement associée à une étiologie virale dans l'espèce humaine. Elle est principalement une conséquence de désordres génétiques (neuropathies, myopathies, trisomie 18,...) ou liée à une limitation physique de la mobilité fœtale (malformation utérine, grossesse multiple,...). Comment dès lors expliquer l'influence telle d'un agent infectieux comme le SBV dans les espèces de ruminants ? La réponse se trouve peut-être derrière le type de placentation. Dans les espèces bovine, ovine et caprine, le placenta de type synépithéliochorial empêche tout transfert d'élément immunitaire de la femelle vers son fœtus durant la gestation, rendant ainsi celui-ci particulièrement dépendant du colostrum dès les premières heures de vie. Dans l'espèce humaine, *a contrario*, le transfert transplacentaire des anticorps maternels est une réalité, autorisée par une placentation hémochoriale. Celle-ci est caractérisée par une invasion majeure du trophoblaste dans le myomètre, assurant le contact avec le sang maternel et le partage de facteurs d'immunité protecteurs durant la vie fœtale.

Parmi les observations marquantes réalisées durant la campagne d'agnelages de janvier 2012, doivent être mis en exergue le fait de retrouver au sein d'une même portée un agneau SBV et un ou plusieurs agneaux cliniquement sains, et le sex ratio mâle : femelle de 21 :7. Si aucune réponse n'a pu clairement être formulée concernant le second élément, Laloy et al. (2017) ont démontré que la colonisation des cotylédons par le SBV est un phénomène aléatoire pouvant dès lors impacter seule une fraction ou la totalité d'une portée.

A hauteur du troupeau, cette phase d'émergence virale rapide et intense s'est traduite par une réponse immunitaire d'envergure liée à cette primo-infection : l'évaluation de séroprévalence intra-troupeau évaluée au mois de février 2012 a démontré que 98,8% (417/422) des ovins testés disposaient d'un statut sérologique positif au SBV. En tout état de cause, et sans disposer à ce stade d'éléments relatifs à la durée de l'immunité colostrale vis-à-vis du SBV ainsi que de la durée de l'immunité active, tout laissait à croire que les possibilités de

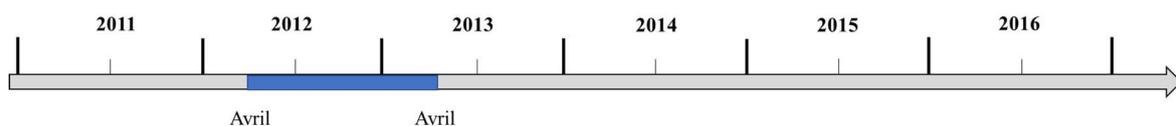
réémergence du virus en 2012 étaient limitées, comme le précise Elbers et al. (2012). En outre, les conditions météorologiques rencontrées durant la période hivernale 2011 – 2012 en Belgique étaient propices à annihiler tout épisode de circulation virale. Mievis (2012) précise que la vague de froid connue entre le 29 janvier 2012 et le 13 février 2012 est l'une des plus intenses rencontrées depuis 1950 avec une température minimale moyenne relevée à Uccle de $-13,0^{\circ}\text{C}$ sur la période considérée. Localement, des températures de $-20,3^{\circ}\text{C}$ et de $-21,0^{\circ}\text{C}$ ont été enregistrées les 4 et 7 février 2012 respectivement sur la commune d'Ohey, limitrophe du CRO (Institut Royal Météorologique, Evènements remarquables).

CHAPITRE III : Episode deuxième ou phase de réexpression virale

Ce chapitre décrit et commente le deuxième épisode de l'infection naturelle au SBV connu dans le troupeau ovin du CRO à savoir la phase dite de réexpression virale. Les données ici présentées cherchent à répondre aux objectifs suivants :

- ✓ *Dans quelle fenêtre temporelle la réexpression virale est-elle observée au sein du troupeau ovin du CRO ?*
- ✓ *Quel impact clinique / lésionnel lui est-il associé ?*
- ✓ *Une évolution de la séoprévalence intra-troupeau est-elle observée suite à cette phase de réexpression virale ?*
- ✓ *Quelle est la durée de l'immunité colostrale chez l'agneau né de mère infectée ou réinfectée naturellement par le SBV durant la gestation ?*

Chronologiquement, les investigations décrites dans ce chapitre se sont échelonnées durant la période représentée sur la frise suivante :



Les résultats mentionnés dans ce chapitre ont été cités dans les ressources listées ci-dessous :

- ❖ Claine F, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Evaluation of colostral antibody protection in lambs born from ewes infected with Schmallerberg virus during pregnancy. Autumn Meeting of the Belgian Society of Physiology and Pharmacology, Brussel, 2012 (poster)
- ❖ Claine F, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Decay of colostral antibodies in lambs born from ewes naturally infected by Schmallerberg virus. International Veterinary Immunology Symposium, Milano, 2013 (poster)
- ❖ Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Evidences for re-emergence of Schmallerberg virus during summer and autumn 2012 among naïve female lambs and immunized ewes. EPIZONE Congress, Brussels, 2013 (oral presentation)
- ❖ Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Schmallerberg virus among female lambs, Belgium, 2012. *Emerg Infect Dis.* 2013 ;19(7) : 1115-1117
- ❖ Claine F, Heckel J, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Passive immunity against Schmallerberg virus in lambs born from naturally infected ewes. EPIZONE Congress, Copenhagen, 2014 (poster)
- ❖ Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Schmallerberg virus infection of ruminants: challenges and opportunities for veterinarians. *Veterinary Medicine: Research and Reports.* 2015 ;6 :261-272
- ❖ Claine F, Wiggers L, Coupeau D, Muylkens B, Kirschvink N. Modelized evolution of Schmallerberg virus seroprevalence in a sheep flock. World Buiatrics Congress, Dublin, 2016 (poster)

- ❖ Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Schmallerberg virus infection in sheep: a model of within-herd seroprevalence evolution. AESA International Conference, Liège, 2016 (oral presentation)
- ❖ Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Modelling the evolution of Schmallerberg virus seroprevalence in a sheep flock after natural infection. *Prev Vet Med.* 2018 ; 154 :132-138

A. Mise en évidence de la phase de réexpression virale

Comme il a été décrit dans le chapitre précédent, la fenêtre temporelle au cours de laquelle le SBV a émergé et circulé au sein du troupeau ovin du CRO dépendant de l'UNamur s'est étalée du début du mois de septembre 2011 jusque fin du mois d'octobre de la même année. Cette émergence virale, et l'infection transplacentaire dont elle a été rendue responsable, a entraîné l'observation dès le début du mois de janvier 2012 de malformations congénitales auprès de 17% (28/163) des agneaux nés. Elle s'est également traduite par un haut degré de séroprévalence intra-troupeau estimée à 98,8% courant du mois de février 2012. Un tel degré de séroprévalence était supposé limiter toute résurgence virale (Elbers et al., 2012).

Contre toute attente, la réexpression virale a été constatée auprès d'un groupe de 50 agnelles sentinelles au sein du troupeau ovin du CRO entre la mi-juillet et la mi-octobre 2012 selon le schéma d'investigation détaillé sur la **figure 14**. Ce groupe d'agnelles sentinelles était constitué de 38 individus nés durant la campagne d'agnelages du mois d'octobre 2011 et de 12 individus nés durant le mois de janvier 2012. Il s'agit ainsi d'un ensemble de jeunes ovins nés de brebis infectées par le SBV durant leur gestation et disposant d'anticorps colostraux à leur naissance. Leur intégration au groupe sentinelle a été réalisée une fois l'immunité maternelle disparue et la séronégativité dès lors atteinte.

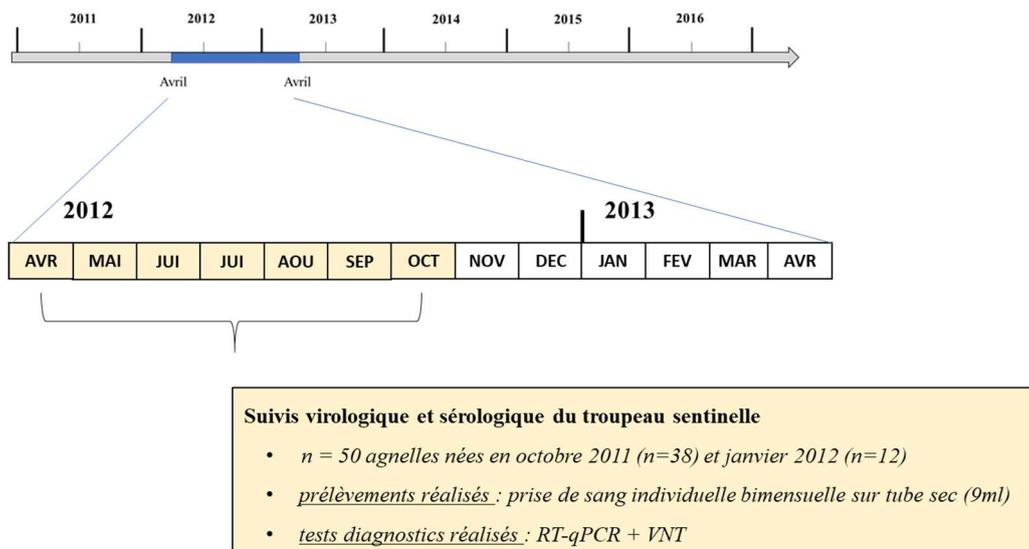


Figure 14 : Description synthétique de la méthodologie déployée dans le cadre des suivis virologique et sérologique du troupeau sentinelle au sein du CRO

Les suivis virologique (RT-qPCR) et sérologique (VNT) de cette population ont démontré l’infection virale et la réponse immunitaire auprès de la totalité des animaux. En outre, il est apparu que la durée de la virémie était plus longue auprès des ovins infectés naturellement par le SBV qu’auprès d’individus infectés expérimentalement.

Comme l’illustre la **figure 15**, l’infection du troupeau sentinelle par le SBV s’est initiée aux alentours de la mi-juillet et s’est clôturée à la mi-octobre 2021. Avant cette période, aucun résultat RT-qPCR ne s’est révélé positif. Les premiers résultats positifs à l’épreuve diagnostique directe ont été obtenus par analyse des prélèvements sanguins opérés en date du 27 juillet. Entre le mois d’août et le mois d’octobre, 80% des animaux sentinelles se sont révélés positifs à ce même test. Au 17 octobre 2012, au moins un résultat RT-qPCR positif a été obtenu pour chaque animal du troupeau sentinelle (Ct médian : 37,03 ; min : 29,4, max : 39,5). La réalisation des VNT a permis de mettre en évidence la réponse humorale à l’infection naturelle au SBV. Les résultats sérologiques positifs apparaissent dans un délai de 2 à 4 semaines après diagnostic virologique positif.

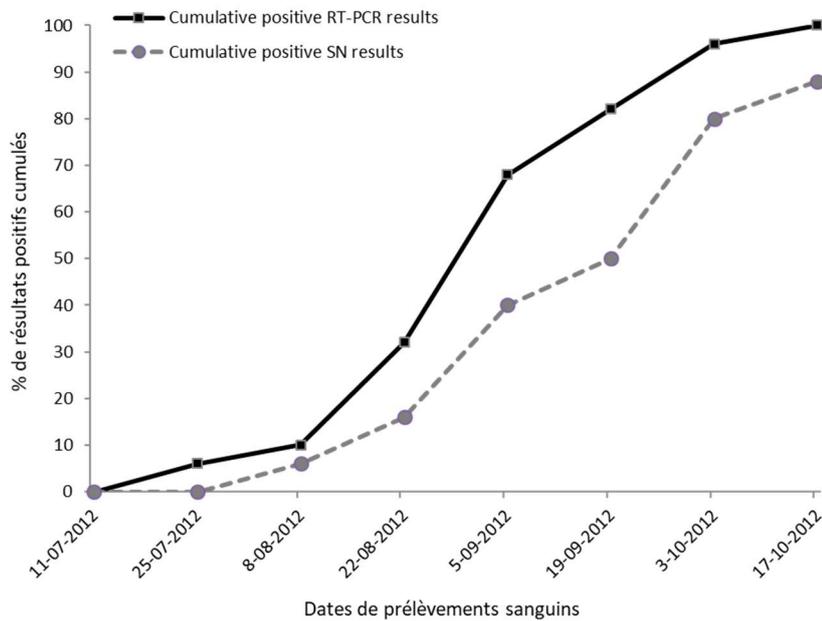


Figure 15 : Circulation du SBV au sein du groupe d’agnelles sentinelles (n=50) objectivée par diagnostic direct (RT-qPCR) et diagnostic indirect (VNT). Les résultats positifs cumulés ($Ct < 40$ et $\log_2 ED_{50} > 3,49$) obtenus entre juillet et octobre 2012 sont exprimés en pourcentage (modifié d’après Claine et al., 2012).

Durant cette période de réexpression virale, il est intéressant de noter qu’aucun signe clinique n’a été constaté auprès des individus composant le troupeau sentinelle.

Un élément tout-à-fait inédit est notifié au cours du suivi virologique des agnelles : 10 d’entre elles (20% de l’effectif total) présentent deux résultats RT-qPCR positifs à 15 jours d’intervalle (**figure 16**).

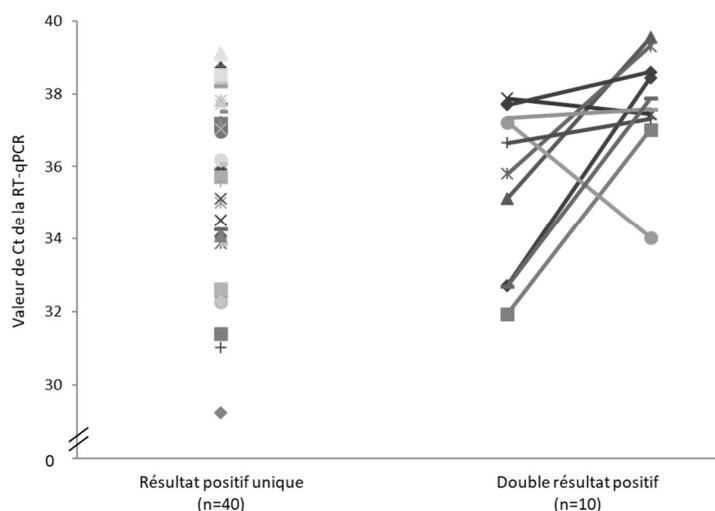


Figure 16 : Valeurs individuelles de Ct obtenues par RT-qPCR auprès du groupe de 50 agnelles sentinelles au moment de la phase de réexpression du SBV au sein du troupeau du CRO. Les valeurs de Ct sont réparties en deux groupes : les agnelles ayant présenté une seule valeur de Ct positive (n=40) et les agnelles ayant présenté deux valeurs de Ct positives à 15 jours d'intervalle (n=10) (modifié d'après Claine et al., 2012).

Enfin, l'approche individualisée des résultats selon la période de naissance des agnelles constituant le groupe sentinelle a fait apparaître que les animaux nés en octobre 2011 subissent une infection au SBV plus précoce que les individus nés en janvier 2012 (**tableau 8**). Ce décalage temporel entre les deux sous-populations était de 4 semaines.

Dates de prélèvements sanguins	11/07/ 2012	25/07/ 2012	8/08/ 2012	22/08/ 2012	5/09/ 2012	17/09/ 2012	3/10/ 2012	17/10/ 2012
Résultats positifs RT-qPCR cumulés (n et %)								
Agnelles nées en automne 2011 (n=38)	0	3 (8%)	5 (13%)	11 (29%)	25 (66%)	30 (79%)	36 (95%)	38 (100%)
Agnelles nées en janvier 2012 (n=12)	0	0	0	5 (42%)	9 (75%)	11 (92%)	12 (100%)	12 (100%)
Résultats positifs VNT cumulés (n et %)								
Agnelles nées en automne 2011 (n=38)	0	0	3 (8%)	8 (21%)	18 (47%)	22 (58%)	33 (87%)	35 (92%)
Agnelles nées en janvier 2012 (n=12)	0	0	0	0	2 (17%)	2 (17%)	6 (50%)	8 (67%)

Tableau 8 : Circulation du SBV au sein du groupe d'agnelles sentinelles (n=50) objectivée par diagnostic direct (RT-qPCR) et diagnostic indirect (VNT). Les résultats positifs cumulés (Ct<40 et log₂ED50 > 3,49) obtenus entre juillet et octobre 2012 sont exprimés en nombre et en pourcentage (modifié d'après Claine et al., 2012).

B. Conséquences de l'épisode de réexpression sur l'immunité du troupeau

A l'instar de la démarche d'investigation opérée au début de l'année 2012 suite à l'émergence du SBV au sein du troupeau ovin du CRO, une approche descriptive transversale s'est également déployée dans le cadre de la phase de réexpression virale. Les conséquences de cet épisode sur l'immunité du troupeau sont ici abordées balayant successivement les aspects lésionnels et sérologiques (évaluation de la séroprévalence intra-troupeau et détermination de la durée de l'immunité colostrale).

B.1 Etat de production des lots au moment de la phase de réexpression

D'une manière identique à ce qui a été constaté lors de la phase d'émergence virale, la période de réexpression du SBV s'est superposée aux périodes de lutte des brebis dont l'agnelage était prévu soit pour le mois de janvier 2013 (n=103), soit pour les mois de mars et d'avril 2013 (n=86) (**figure 17**). Ainsi, les brebis agnelant en janvier 2013 se trouvaient en pleine période de lutte au moment où la circulation virale était attestée au sein du groupe d'agnelles sentinelles tandis que celles agnelant aux mois de mars et d'avril 2013 ont été mises au bélier en toute fin de phase de circulation du SBV.

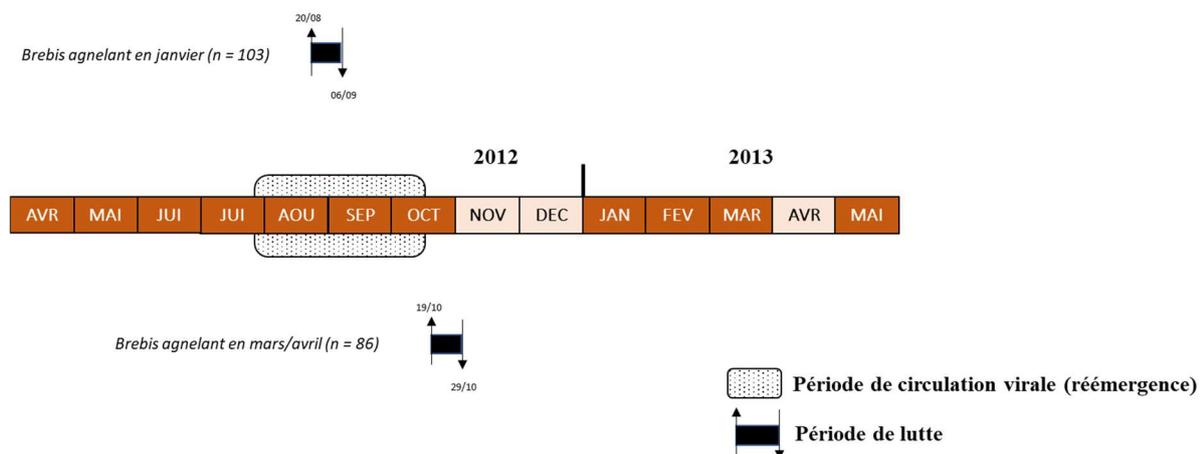


Figure 17 : Superposition de la période de réexpression du SBV et des périodes de lutte des lots de brebis agnelant en janvier 2013 (n= 103) et en mars/avril 2013 (n=86)

B.2 Manifestations lésionnelles observées

Les désordres lésionnels observés suite à la phase de réexpression virale se sont distingués de ceux recensés suite à la période dite d'émergence tant au niveau de leur prévalence qu'au niveau du tableau lésionnel présenté. L'approche déployée était identique à celle mise en œuvre quelques mois auparavant à savoir l'autopsie des agneaux suspects d'infection transplacentaire au SBV, la description des lésions macroscopiquement visibles, la biopsie de tissus nerveux centraux et l'emploi de la RT-qPCR comme outil de diagnostic direct.

Ainsi, seuls cinq agneaux confirmés PCR positifs ont été recensés. Ils sont issus de brebis multipares ayant connu la période d'émergence virale courant la fin de l'été 2011 et confirmées séropositives lors de l'évaluation de la séroprévalence intra-troupeau au mois de février 2012. Trois de ces agneaux sont des avortons expulsés au mois de janvier 2013 dépourvus de toute anomalie congénitale tandis que deux sont des agneaux mort-nés nés en mars 2013 (n=1) et en avril 2013 (n=1). Ces deux derniers individus présentaient des malformations congénitales : arthrogrypose, *spina bifida* sacrée et atrophie testiculaire pour le premier, arthrogrypose et fente palatine pour le second. Les valeurs de Ct obtenues au travers de la réalisation de la RT-qPCR auprès des prélèvements de tissus nerveux centraux effectués sur ces agneaux sont repris dans le **tableau 9** ci-dessous.

Tableau 9 : Malformations congénitales et valeurs de Ct issues de la RT-qPCR opérée sur biopsies de tissus nerveux centraux prélevés auprès d'avortons et d'agneaux mort-nés suspects d'infection transplacentaire au SBV et produits suite à la période de réexpression virale

	Période	Malformations congénitales	Valeur Ct
Agneau 1	Janvier 2013	Néant	31,1
Agneau 2	Janvier 2013	Néant	31,1
Agneau 3	Janvier 2013	Néant	35,6
Agneau 4	Mars 2013	Arthrogrypose – <i>Spina bifida</i> – Atrophie testiculaire	31,0
Agneau 5	Avril 2013	Arthrogrypose – Fente palatine	34,1

La superposition des périodes de lutte des brebis concernées par le recensement d'agneaux SBV dans leur progéniture et la période de circulation virale permet d'expliquer l'hétérogénéité du tableau lésionnel. Force est de croire que la circulation du SBV s'est poursuivie au-delà de la mi-octobre, ce qui permettrait alors d'expliquer l'observation d'un tableau lésionnel sur des agneaux nés de brebis infectées entre le 30ème et le 50ème jour de gestation correspondant, pour le lot de brebis à la lutte entre le 19 octobre et le 29 octobre, à une fenêtre temporelle comprise entre le 17 novembre et le 17 décembre 2013.

B.3 Evaluation de la séroprévalence intra-troupeau

Au mois de février 2013, une photographie sérologique du troupeau ovin du CRO a été réalisée dans le but d'évaluer la séroprévalence intra-troupeau après cette phase de réexpression virale et de potentiellement l'effet booster de celle-ci sur l'immunité du troupeau.

Comme illustré sur la **figure 18**, une prise de sang individuelle a été opérée auprès de 113 brebis dont le sang avait déjà été prélevé lors de l'évaluation de la séroprévalence intra-troupeau au mois de février 2012. Les séra collectés ont fait l'objet d'un VNT.

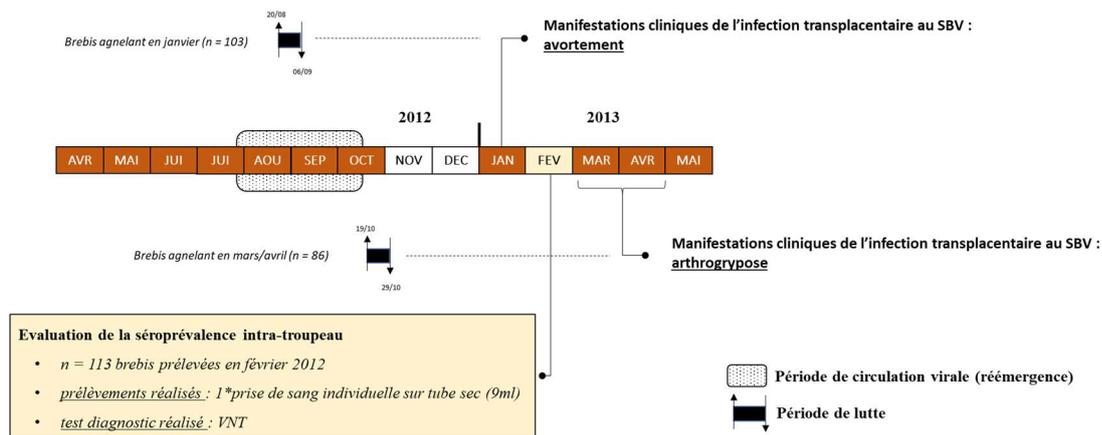


Figure 18 : Description synthétique de la méthodologie déployée dans le cadre de l'évaluation de la séroprévalence intra-troupeau suite à l'épisode de circulation du SBV connu par le troupeau sentinelle au sein du CRO

Il ressort de cette analyse que 100% (113/113) des ovins testés disposent d'un statut sérologique positif au SBV. En outre, une augmentation significative ($p < 0,05$) du taux médian en anticorps anti-SBV est constatée entre les mois de février 2012 et février 2013. Ces taux étaient respectivement de 7,47 (4,98 – 9,97) et de 8,47 (5,98 – 10,96), exprimés sous forme de \log_2 ED50.

B.4 Durée de l'immunité colostrale

Afin d'évaluer la durée de l'immunité colostrale et le transfert d'immunité dirigée contre le SBV de la brebis à son(ses) agneau(x), l'investigation suivante a été mis en œuvre.

Un total de 60 agneaux formé de deux groupes nommés « L12 » et « L13 » en référence à leur année de naissance a été étudié. Ainsi, au sein de groupe « L12 », se retrouvent 30 agneaux (10 nés en janvier, 10 en mars et 10 en mai 2012) nés de brebis (n=25) primo-infectées par le SBV courant l'automne 2011. Le groupe « L13 » quant à lui est composé de 30 agneaux (10 nés en janvier, 10 en mars et 10 en juin 2013) nés de brebis (n =25) ayant connu les deux épisodes de circulation virale. Ces agneaux ont tous subi un prélèvement sanguin à la naissance (t0), 48 heures après ingestion du colostrum (t48) puis de manière bimensuelle

jusqu'à 150 jours après leur naissance. En outre, un prélèvement sanguin et une collecte de colostrum ont été effectués auprès de chacune des brebis mères au moment de l'agnelage.

Les résultats font apparaître des niveaux d'anticorps anti-SBV jugés indétectables à la naissance pour la totalité des agneaux suivis (60/60). *A contrario*, 48 heures après ingestion du colostrum, le titre médian en anticorps anti-SBV, exprimé sous forme du \log_2 ED50, est clairement positif et significativement plus élevé auprès des agneaux du groupe « L13 » que des agneaux du groupe « L12 » (**figure 19**). Précisément, les valeurs médianes (min-max) obtenues sont égales à 9,47 (6,98-10,97) pour les individus du groupes « L12 » et 10,46 (8,47-12,46) pour les individus du groupe « L13 ». Aucun effet lié au mois de l'agnelage n'a été détecté au sein d'une même année.

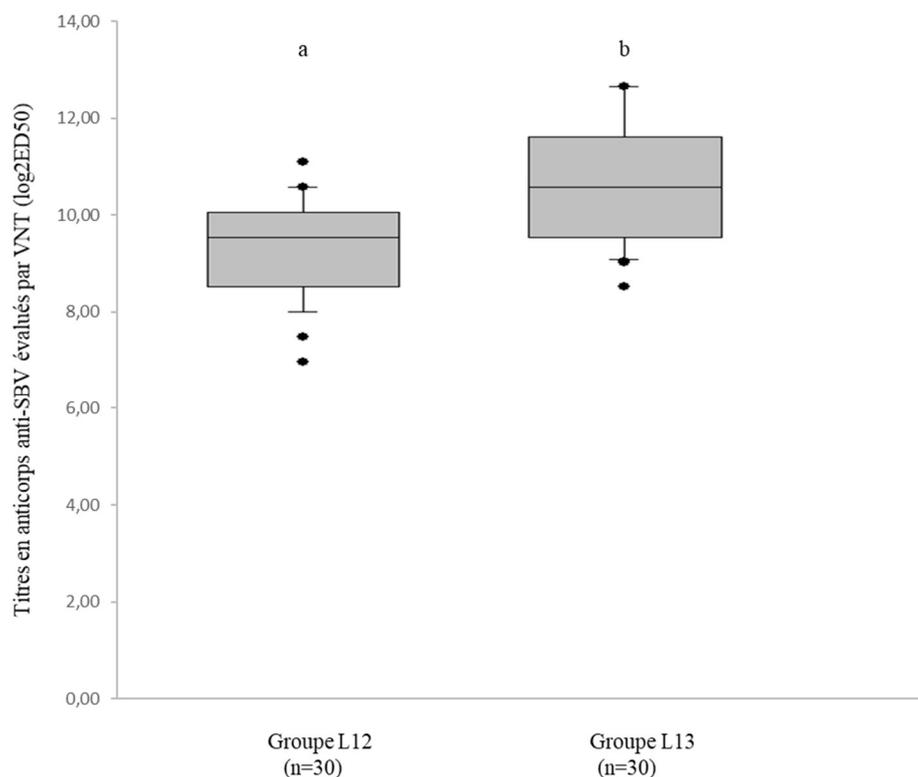


Figure 19 : Titres en anticorps anti-SBV évalués par VNT auprès d'agneaux nés en 2012 (groupe L12 ; n=30) et nés en 2013 (groupe L13 ; n=30) 48 heures après ingestion du colostrum. Les résultats sont exprimés sous forme de \log_2 ED50. Les valeurs notées a et b sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Chez les brebis, une augmentation significative des taux en anticorps anti-SBV est également constatée dans les échantillons de colostrum entre les années 2012 et 2023. Les titres médians (min-max) en anticorps, exprimés ici aussi sous forme du \log_2 ED50, sont égaux à 11,46 (9,47-12,46) en 2012 et 12,46 (10,96-12,46) en 2013. Aucun effet du mois de l'agnelage n'a été constaté au sein d'une même année. Enfin, aucune différence significative dans les titres en anticorps n'a été mise en évidence dans les échantillons sanguins des brebis et en confrontant les résultats obtenus auprès des femelles primipares par rapport à ceux obtenus auprès des femelles multipares.

Concernant la durée de protection colostrale chez l'agneau, définie comme le temps nécessaire pour obtenir un résultat séronégatif au VNT (\log_2 ED50 < 3,49) après ingestion et absorption du colostrum, elle présente une valeur médiane de 81 jours (69-132) pour les agneaux nés en 2012 et de 122 jours (74-144) pour ceux nés en 2013 (**figure 20**). Des résultats présentant un caractère significativement différent et suggérant une fois encore l'effet booster de l'épisode de réexpression virale sur le statut immunitaire des ovins.

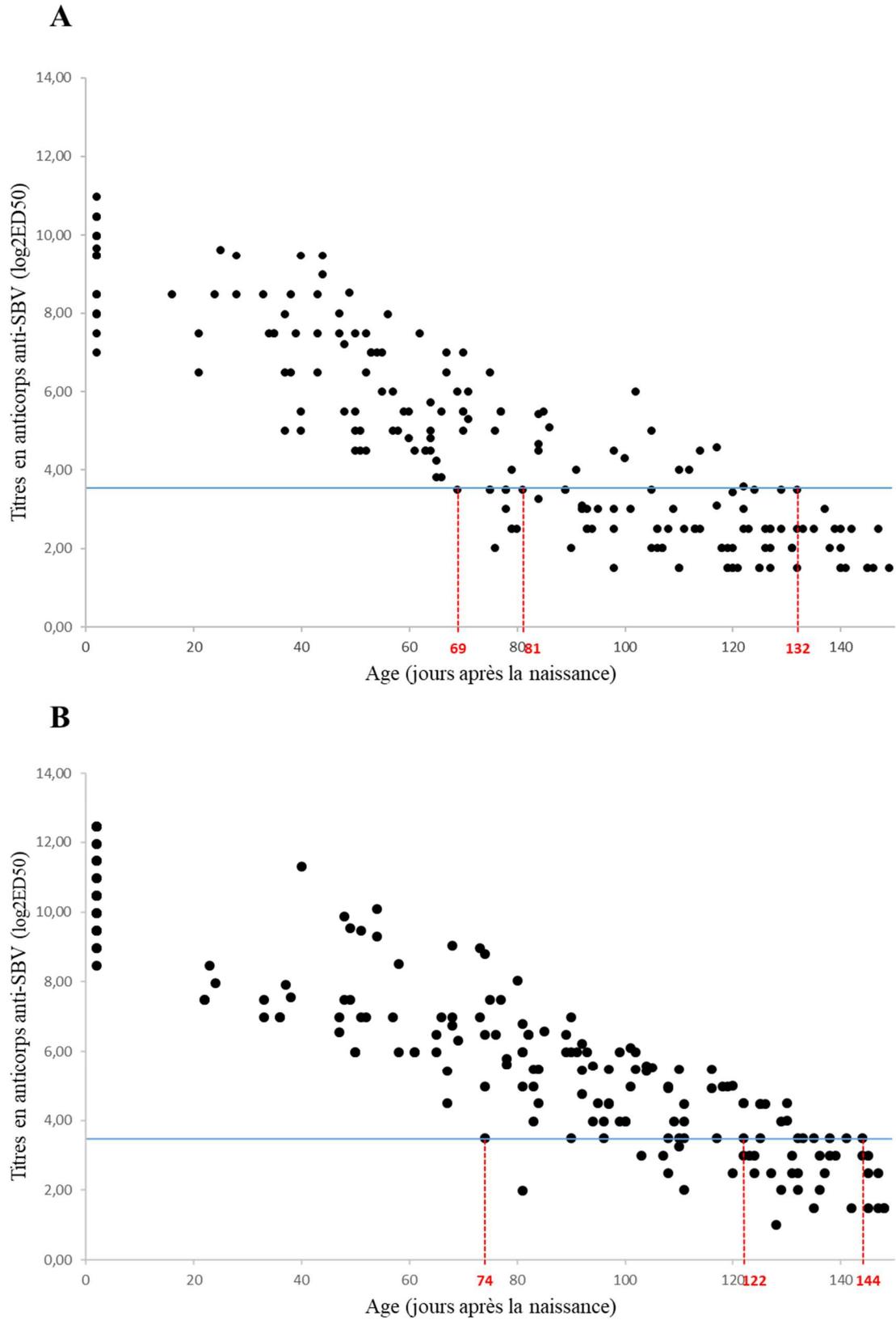


Figure 20 : Décroissance des anticorps colostraux anti-SBV auprès d'un groupe d'agneaux nés en 2012 de brebis ayant connu la phase d'émergence du SBV ($n=30$) (A) et auprès d'un groupe d'agneaux nés en 2013 de brebis ayant connu les deux épisodes de circulation virale ($n=30$) (B). Les résultats sont exprimés comme l'âge médian (min-max ; en jours après la naissance) auquel l'animal devient séronégatif. Les titres en anticorps sont exprimés sous forme de \log_2ED_{50} .

C. Intérêts et limites des méthodes déployées

Des investigations menées et décrites dans le cadre de ce chapitre portant sur l'épisode de réexpression virale doit être premièrement abordée celle du suivi du troupeau d'agnelles sentinelles. La constitution de ce groupe d'individus nés de brebis infectées naturellement par le SBV mais, au démarrage de leur monitoring, lâchés par l'immunité passive maternelle reçues de celles-ci, assure le déploiement d'une stratégie de suivi plus dynamique et prospective que la surveillance syndromique. La réalisation de prélèvements sanguins bimensuels et systématiquement intégrés dans une approche diagnostique mixte mêlant l'abord virologique de la RT-qPCR et l'abord sérologique de la VNT a permis de mettre en évidence de manière précoce la fenêtre de circulation virale et d'attester d'une réponse humorale individuelle avec un délai de 2 à 4 semaines. En outre, ce suivi a permis de souligner l'écart d'appréciation de la durée de la virémie chez le ruminant entre les observations opérées en cas d'infection expérimentale (6 jours) et celles effectuées dans le cadre d'une infection naturelle (15 jours) (Hoffmann et al., 2012 ; Poskin et al., 2014).

Dans un deuxième temps, procéder à une évaluation de la séroprévalence intra-troupeau au mois de février 2013 après la fenêtre de réémergence, à l'instar de la photographie sérologique opérée un an plus tôt au sortir de la phase d'émergence du SBV, a renseigné sur l'effet booster de la résurgence virale au niveau de l'immunité du troupeau ovin et le haut degré d'immunisation de celui-ci.

Ces informations ont permis, à hauteur du secteur, d'alerter sur les possibilités de recirculation du SBV dans des troupeaux disposant pourtant d'un degré de séroprévalence d'ores et déjà élevé suite à l'émergence virale et donc, potentiellement, la probabilité de voir se manifester de nouvelles vagues d'avortements et de malformations congénitales au cours des campagnes d'agnelages à suivre. Des éléments propres au secteur ovin qui, en raison d'un

rythme accéléré de production et d'une prolificité maternelle plus élevée chez la brebis que chez la vache, voit émerger annuellement une importante population d'individus immunitairement naïfs.

Au suivi du troupeau d'agnelles sentinelles, il aurait été pertinent d'associer un monitoring de la population vectorielle évoluant à proximité du troupeau par piégeage, tri, discernement des profils et recherche du pathogène par PCR à des fins d'évaluation de la densité, de description de la typologie des populations de diptères et de monitoring de la circulation virale. A l'instar des questionnements soulevés quelques années auparavant lors de l'épidémie de BTV, de nombreuses interrogations se sont posées sur le maintien du SBV entre périodes de circulation dans l'espèce ovine que ce soit dans la population vectorielle comme dans les troupes de ruminants sauvages (Linden et al., 2010 ; Bayrou, 2019).

Enfin, l'évaluation de la durée de l'immunité colostrale revêt un intérêt primordial parce qu'elle permet d'appréhender le déploiement d'une stratégie vaccinale. Dans cette étude, l'étendue de l'immunité passive chez l'agneau n'a été envisagée et estimée que sur la seule base de l'évaluation de la décroissance des anticorps colostraux. Or, les acteurs immunitaires colostraux ne sont pas exclusivement humoraux. Le colostrum est ainsi source d'une quantité importante de cellules, essentiellement des leucocytes aux nombreux rôles telles l'immunomodulation et la mémoire. L'approche de la durée de l'immunité colostrale sous l'abord exclusivement humoral peut ainsi sous-estimer l'intensité et l'étendue temporelle de celle-ci.

D. Discussion

Nombreux sont ceux, à l'instar d'Elbers et al. (2012), qui ont cru que le niveau élevé de séroprévalence intra-troupeau engendré par l'épisode d'émergence du SBV en 2011 allait drastiquement limiter les possibilités de résurgence virale l'année civile suivante, d'autant plus que les conditions météorologiques rencontrées dans nos régions durant l'hiver 2011-2012 laissaient peu de doute sur la survie des culicoïdes vecteurs du SBV. C'était oublier là plusieurs éléments notables au rang desquels figurent les caractéristiques mêmes de régie des troupeaux ovins, en particulier professionnels. En effet, en raison d'un taux de prolificité et de renouvellement élevés mais aussi d'un rythme de reproduction plus soutenu, le pourcentage d'individus naïfs au sein d'une population ovine peut s'accroître très rapidement et favoriser ainsi la recirculation du virus. Ainsi, fin du premier trimestre de l'année 2012, un total de 717 ovins composait le troupeau du CRO. Parmi ceux-ci, pas moins de 305 agneaux et agnelles âgés de 0 à 6 mois étaient dénombrés. Il y avait donc au sortir de la période hivernale 2011-2012 un nombre élevé de jeunes ovins défaits de leur protection colostrale et, par définition, sensibles à l'infection virale. A côté des éléments de régie de troupeau, s'est élevée aussi rapidement la question du passage de l'hiver des différentes espèces de culicoïdes, vecteurs décrits du SBV, dans un contexte de virémie somme toute furtive. De Regge et al. (2017), dans son étude, a retenu plus particulièrement l'hypothèse selon laquelle le cycle d'infection vecteur/hôte se maintient en sourdine. Ceci est étayé par Wernike et al. (2013) qui évoquent des cas de transmission hivernale du SBV ainsi que Mehlhorn et al. (2009) précisant que la présence de culicoïdes adultes actifs est certes moins importante mais décelable en période hivernale. Plus récemment, l'étude de Kęsik-Maliszewska et al. (2019) a étayé le fait que le passage hivernal du SBV peut également être le fruit d'une transmission transovarienne dans les diptères vecteurs.

Ainsi, au terme de « réémergence » préalablement employé pour qualifier le deuxième épisode ici décrit, il a été finalement préféré celui de « réexpression ». Cette modification de nomenclature souligne le fait qu'il est peu pertinent de croire que le SBV a totalement disparu du site du CRO, et plus globalement du territoire wallon, durant la saison hivernale 2011-2012. Une circulation s'est très probablement maintenue à bas bruit jusqu'à profiter d'un accroissement du nombre d'individus séronégatifs et de conditions météorologiques favorables aux diptères pour engendrer l'infection du troupeau d'agnelles sentinelles. Le SBV n'est donc pas réapparu après avoir totalement disparu mais s'est bel et bien réexprimé de manière telle que sa circulation a pu être décelée et que des manifestations lésionnelles inhérentes à l'infection transplacentaire ont été observées.

Comparativement à la période d'émergence virale, largement décrite dans le chapitre précédent, et dont la durée a été estimée à 2 mois, celle connue en 2012 s'est davantage étalée dans le temps, à savoir de fin juillet à mi-octobre. En outre, comme l'a suggéré l'analyse du tableau lésionnel recensé en 2013 par rapport aux dates de lutte des lots de brebis, une circulation plus tardive du SBV jusqu'aux prémices de l'hiver serait tout-à-fait probable. *A contrario*, les répercussions de cette phase de réexpression du SBV, en termes d'atteinte clinique, se sont révélées moindres : sur les 321 agneaux nés entre le mois de janvier 2013 et le mois d'avril 2013, seuls 5 agneaux SBV (3 avortons et 2 mort-nés) ont été recensés. Parmi ces deux individus mort-nés, les malformations particulières décrites à savoir la *spina bifida* et la fente palatine pourraient être la traduction d'une infection virale plus précoce durant la gestation que celle connue l'année précédente par le lot de brebis agnelant au mois de janvier 2012. Cette phase de réexpression virale a présenté ainsi une durée inversement proportionnelle à son intensité. Ceci n'évoque rien d'étonnant dans la mesure où la quasi-totalité des femelles qui se trouvaient en lutte concomitamment à cette période de circulation étaient des brebis multipares ayant expérimenté, un an auparavant, une première rencontre avec le SBV. Comment expliquer

cependant qu'avortements et malformations congénitales aient toutefois pu être observés sur des produits nés de brebis de parité au moins égale à 2 ? Ces brebis n'étaient-elles pas toutes immunisées puisqu'ayant rencontré le SBV dès l'automne 2011 ? Si le titre médian en anticorps anti-SBV évalué par VNT en février 2012 a bel et bien attesté d'une réponse immunitaire de groupe, il n'en demeure pas moins que certains individus ont répondu de manière plus discrète à cette primo-exposition. Auprès des 5 brebis concernées, la valeur médiane (min-max) du titre en anticorps exprimé en \log_2 ED50 est de 7,47 (4,48-7,47), autrement dit au-delà du seuil de séropositivité. Cette évaluation a eu cependant lieu 5 mois après leur primo-exposition et ne préjuge en rien du maintien d'un taux d'anticorps circulants suffisant au moment de la réexpression virale.

Agissant telle une dose de rappel dans le cadre d'un schéma de primo-vaccination, ce deuxième épisode a engendré un effet booster sur les titres sériques en anticorps anti-SBV évalués selon différents motifs : l'évaluation de la séroprévalence intra-troupeau en février 2013 par rapport à celle de février 2012, la comparaison des titres en anticorps maternels après ingestion de colostrum et le temps de persistance de ceux-ci chez des agneaux nés de mères doublement infectées par rapport aux agneaux nés de mères ayant connu une seule infection virale. Pareille observation a été réalisée au niveau du colostrum des brebis agnelant en 2013 : celui-ci présentait des titres en anticorps anti-SBV significativement plus élevés que le colostrum collecté en 2012 auprès de brebis primo-infectées.

L'approche de la variable « durée de l'immunité colostrale » est d'un intérêt certain dans la mesure où, comme il a été mentionné à plusieurs reprises, elle conditionne le déploiement d'une stratégie vaccinale que ce soit au travers des données ici collectées auprès d'une population ovine, ou celles réunies par Elbers et al. (2014) auprès d'une population bovine. Dans le cas du SBV, il apparaît que la durée de l'immunité colostrale soit de 4 mois chez l'agneau né de mère doublement infectée, à savoir une brebis ayant expérimenté une

double exposition au pathogène (phase d'émergence et phase de réexpression du SBV dans le cas présent). Cette donnée est ainsi comparable aux résultats présentés dans l'étude de Leemans et al. (2013) opérée dans le même troupeau ovin vis-à-vis du BTV : l'immunité colostrale y est décrite comme neutralisante vis-à-vis de la substance vaccinale (BTVPUR ALSAP®) jusqu'au moins 3 mois après la naissance. Il s'agit là d'une approche exclusivement humorale qui, tant du côté BTV que SBV, devrait être complétée par une approche cellulaire, non détectable par VNT mais dont l'impact si non inhibiteur tout du moins modulateur est supposé.

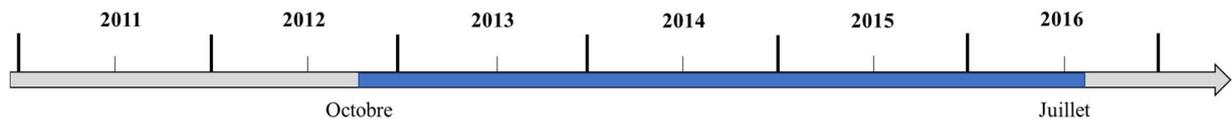
Enfin, et c'est là un élément notable mis en évidence au travers de cette détection de la phase dite de réexpression virale, l'ensemble des agnelles sentinelles a été détecté « positif » au travers du test PCR alors que les prises de sang étaient effectuées de manière bimensuelle. Dix individus du groupe sentinelle ont présenté deux résultats RT-qPCR positifs à 15 jours d'intervalle. Il s'agit là d'un résultat de prime abord surprenant dans la mesure où il indique que la durée de la virémie en cas d'infection naturelle chez l'ovine est plus longue que celle évaluée en cas d'infection expérimentale tant chez le bovin (Hoffmann et al., 2012) que chez l'ovine (Poskin et al., 2014). Peut-être cet élément est-il, à côté des facteurs précédemment évoqués de type saisonnalité de la reproduction ou encore taux de prolificité élevé, un promoteur de sensibilité de l'espèce ovine au SBV.

CHAPITRE IV : Episode troisième ou phase de latence

Ce chapitre décrit et commente le troisième épisode de l'infection naturelle au SBV connu dans le troupeau ovin du CRO à savoir la phase dite de latence. Celle-ci correspond à la période durant laquelle aucun épisode de circulation du SBV n'a été objectivée au sein du dit troupeau. Les données ici présentées cherchent à répondre aux objectifs suivants :

- ✓ *Quelle a été la durée de cette période de latence ?*
- ✓ *Quelle est la durée de l'immunité active développée par des ovins infectés par le SBV, ceux ayant connu les deux épisodes de circulation virale et ceux n'en ayant vécu qu'un seul ?*
- ✓ *Est-il possible de prédire la résurgence virale sur base de données immunologiques et des éléments de régie de troupeau ?*

Chronologiquement, les investigations décrites dans ce chapitre se sont échelonnées durant la période représentée sur la frise suivante :



L'absence de circulation virale est objectivée par le suivi sérologique d'animaux qualifiés de sentinelles. Parce qu'aucune stimulation antigénique n'est rencontrée durant cette phase de latence, celle-ci se révèle propice à l'évaluation du maintien de l'immunité active mais également à la réflexion concernant la probabilité de réémergence du SBV dans un troupeau gagnant annuellement en naïveté.

Les résultats mentionnés dans ce chapitre ont été cités dans les ressources listées ci-dessous :

- ❖ Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Long-term immunity against Schmallenberg virus in sheep after natural infection. EPIZONE Congress, Copenhagen, 2014 (poster)
- ❖ Claine F, Prevot C, Wiggers L, Coupeau D, Muylkens B, Kirschvink N. Schmallenberg virus in sheep: evolution of flock susceptibility over years. SVEPM Annual Conference, Ghent, 2015 (présentation orale)
- ❖ Claine F, Wiggers L, Coupeau D, Muylkens B, Kirschvink N. Is flock renewal a risk for novel Schmallenberg virus episode in sheep flocks. EPIZONE Congress, Montpellier, 2015 (présentation orale)
- ❖ Claine F, Wiggers L, Coupeau D, Muylkens B, Kirschvink N. Evolution of Schmallenberg virus seropositivity over years among sheep naturally infected at different ages. EPIZONE Congress, Montpellier, 2015 (présentation orale)
- ❖ Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Schmallenberg virus infection of ruminants: challenges and opportunities for veterinarians. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. 2015 ;6 : 261-272
- ❖ Claine F, Wiggers L, Coupeau D, Muylkens B, Kirschvink N. Modelized evolution of Schmallenberg virus seroprevalence in a sheep flock. World Buiatrics Congress, Dublin, 2016 (poster)
- ❖ Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Schmallenberg virus infection in sheep: a model of within-herd seroprevalence evolution. AESA International Conference, Liège, 2016 (présentation orale)

- ❖ Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Modelling the evolution of Schmallenberg virus seroprevalence in a sheep flock after natural infection. *Prev Vet Med.* 2018 ;154 : 132-138

A. Surveillance sérologique d'une nouvelle vague de circulation virale

Afin d'opérer un monitoring sérologique de la circulation du SBV au sein du troupeau du CRO, un groupe de vingt agnelles qualifiées de sentinelles a été constitué et renouvelé annuellement. Ces animaux, nés de brebis séropositives car infectées naturellement par le SBV durant la phase d'émergence (2011) et de réexpression (2012), ont subi des prélèvements sanguins bimensuels depuis l'âge de quatre mois et jusque l'âge de mise à la lutte comme l'illustre la **figure 21**. Pour des raisons de facilité logistique, avant d'entrer en phase de reproduction, ces animaux ont été remplacés par un nouveau groupe d'agnelles ayant atteint l'âge d'intégration à la population d'ovins sentinelles.

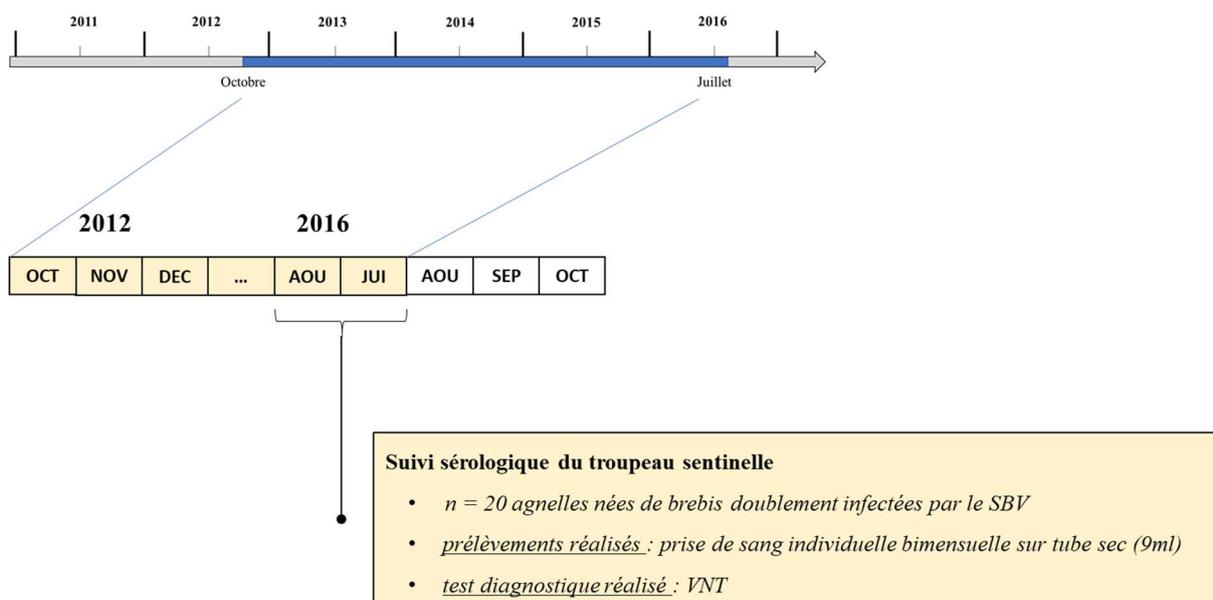


Figure 21 : Description synthétique du protocole déployé dans le cadre du suivi sérologique du troupeau sentinelle au sein du CRO entre le mois d'octobre 2012 et le mois de juillet 2016

Les prélèvements sanguins réalisés auprès du dit groupe ont été traités selon les modalités précédemment décrites afin d'entreprendre les VNT.

La surveillance sérologique ici décrite couvre la période s'étalant du mois d'octobre 2012 au mois de juillet 2016.

Tout au long de cette période, les titres en anticorps des agnelles constituant le groupe sentinelle sont demeurés confinés sous le seuil de séropositivité traduisant ainsi l'absence de séroconversion, et donc, indirectement, l'absence de circulation virale.

B. Evaluation du maintien de l'immunité active

Dans le but d'évaluer le maintien de l'immunité active chez l'ovin naturellement infecté par le SBV, vingt brebis ont été sélectionnées. Ces animaux étaient présents dans le troupeau lors de la phase d'émergence virale (2011) ainsi que durant la phase dite de réexpression (2012). Des prélèvements sanguins ont été réalisés annuellement auprès de ces vingt brebis depuis le début de l'année 2012 jusqu'à la fin de l'année 2015.

Les prélèvements sanguins réalisés auprès du dit groupe ont été traités selon les modalités précédemment décrites afin d'entreprendre les VNT.

Tel que le montre la **figure 22**, les vingt brebis demeurent séropositives depuis le premier prélèvement opéré au début de l'année 2012 jusqu'en fin de suivi, c'est-à-dire en fin d'année 2015.

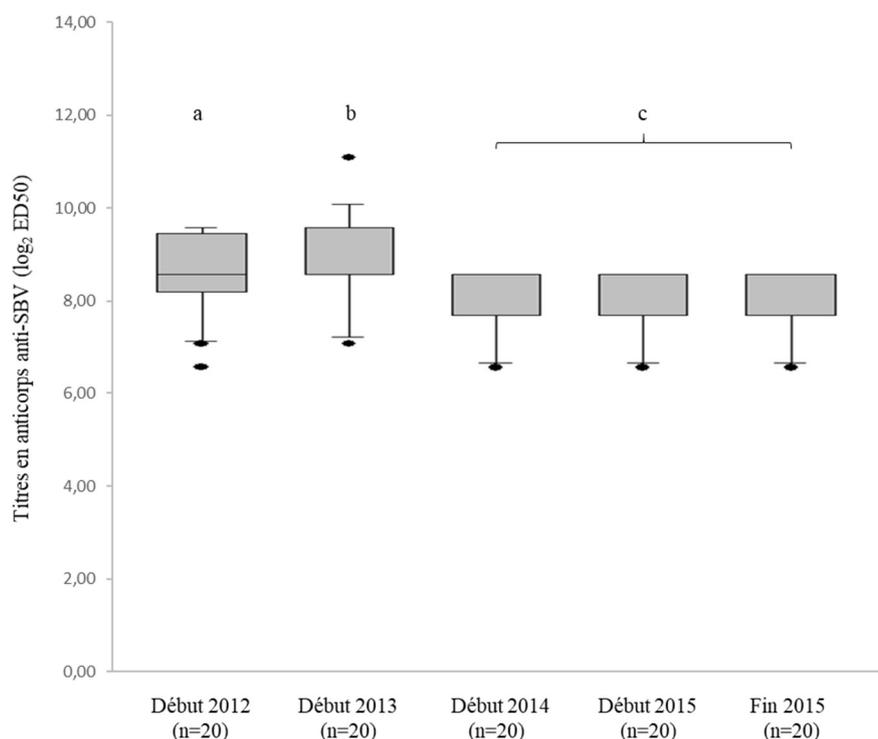


Figure 22 : Evolution des titres en anticorps anti-SBV au sein d'un groupe de brebis ayant connu la phase d'émergence virale (fin 2011) et la phase de réexpression (été 2012). Les résultats obtenus par VNT sont exprimés en valeurs médianes (min-max) du \log_2 ED50. Les éléments notés a, b et c diffèrent significativement ($p < 0,05$) (modifié d'après Claine et al., 2018).

Les titres en anticorps anti-SBV, exprimés comme la valeur médiane (min-max) du \log_2 ED50, ont augmenté de manière significative entre le début de l'année 2012 (8,47 [6,48-9,47]) et le début de l'année 2013 (9,47 [6,96-10,96]) ($p < 0,05$). Entre 2014 et 2015, ces mêmes titres n'ont plus présenté de variation significative et sont restés strictement compris entre 6,47 et 8,47. Ces valeurs sont cependant significativement inférieures à celles évaluées en 2012 et en 2013 ($p < 0,05$).

C. Développement d'un modèle prédictif de la réémergence virale

Le renouvellement annuel connu dans le troupeau et l'accroissement consécutif du nombre d'ovins séronégatifs sont les facteurs conditionnant inéluctablement la résurgence virale. Ce postulat a été établi pour de nombreux arbovirus, à l'instar de AKAV (Kirkland,

2015). Un modèle mathématique fixe caractérisé par un nombre constant d'ovins femelles en âge de reproduire définirait dès lors le nombre d'individus adultes séropositifs et le nombre d'agneaux séropositifs comme étant respectivement égaux à :

Nombres d'ovins adultes SBV séropositifs $y = \text{nombre d'ovins adultes } y - x * (\text{nombre d'ovins adultes } z * \text{taux de renouvellement})$

Nombre d'agneaux SBV séronégatifs $y = \text{prolificité} * \text{nombre d'ovins adultes SBV séropositifs}$
 y

Dans ces équations, la variable « y » représente l'année d'évaluation de la séropositivité au SBV, la variable « z » représente l'année durant laquelle le dernier épisode de circulation virale a été constaté et la variable « x » correspond, quant à elle, à l'intervalle de temps (exprimé en années) compris entre les variables « z » et « y ».

D. Modélisation de l'évolution de la séroprévalence intra-troupeau

Sur base de l'évaluation de la durée de l'immunité colostrale chez l'agneau né de mère infectée par le SBV et l'appréciation de la durée de l'immunité active chez l'ovin adulte ayant subi cette même infection, une esquisse d'évolution de la séroprévalence intra-troupeau a été réalisée. Du mois de janvier 2013 au mois de décembre 2015, le nombre d'individus SBV séropositifs et SBV séronégatifs dans le troupeau du CRO a été estimé de manière mensuelle. Le registre de troupeau a fourni les informations relatives à l'entrée d'individus, à savoir les naissances, et à la sortie d'ovins quel que soit le motif (vente, abattage, réforme, mort naturelle, euthanasie). Le statut « SBV séropositif » ou « SBV séronégatif » a été attribué sur base de l'utilisation de l'arbre décisionnel proposé dans la **figure 23**.

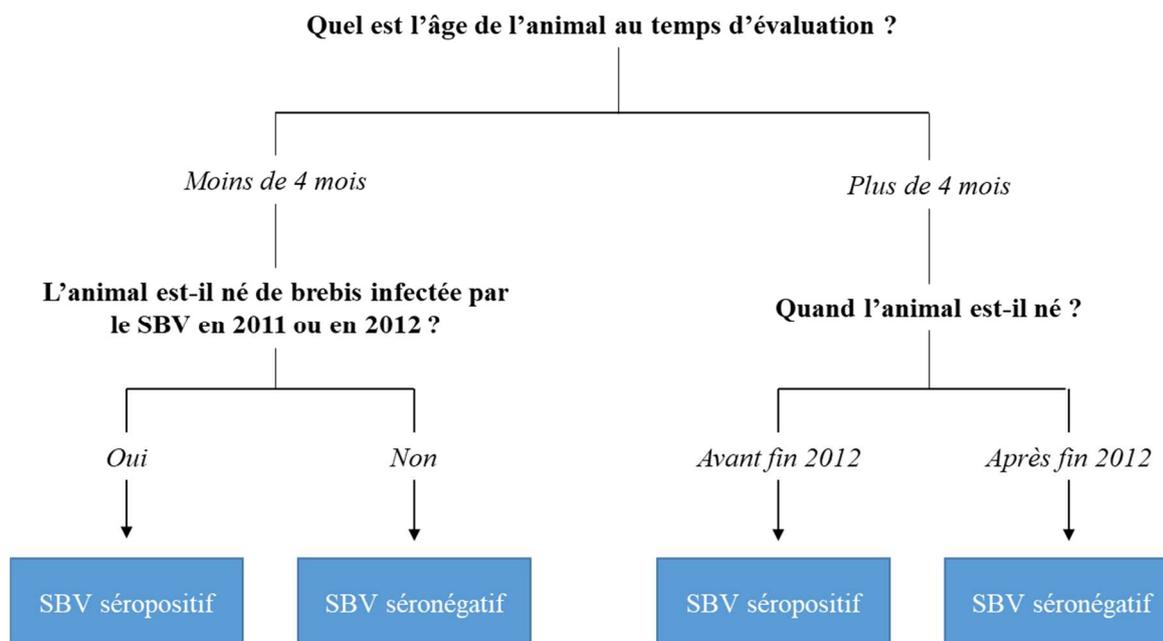


Figure 23 : Arbre décisionnel utilisé pour la modélisation de l'évolution de la séroprévalence au SBV dans le troupeau du CRO tenant compte de la durée de protection colostrale chez l'agneau et de la durée de l'immunité active chez l'ovin adulte (modifié d'après Claine et al., 2018).

Ainsi, tout animal âgé de plus de 4 mois et né avant l'épisode de réexpression virale connu durant l'été 2012 a été considéré comme individu SBV séropositif de même que tout agneau âgé de moins de 4 mois et né de mère infectée par le SBV. Tout animal ne correspondant pas à ces caractéristiques a été supposé SBV séronégatif.

Tenant compte de ces considérations, l'évolution du nombre d'ovins séropositifs et d'ovins séronégatifs (adultes et agneaux) dans le troupeau du CRO a été dessinée. Une décroissance importante de la séropositivité au SBV était ainsi présagée dans le troupeau : si le pourcentage d'animaux séropositifs était égal à 89,9% (673/749) en janvier 2013, il était supposé chuter à une valeur de 33,8% (185/547) au mois de décembre 2015 (**figure 24A-B**).

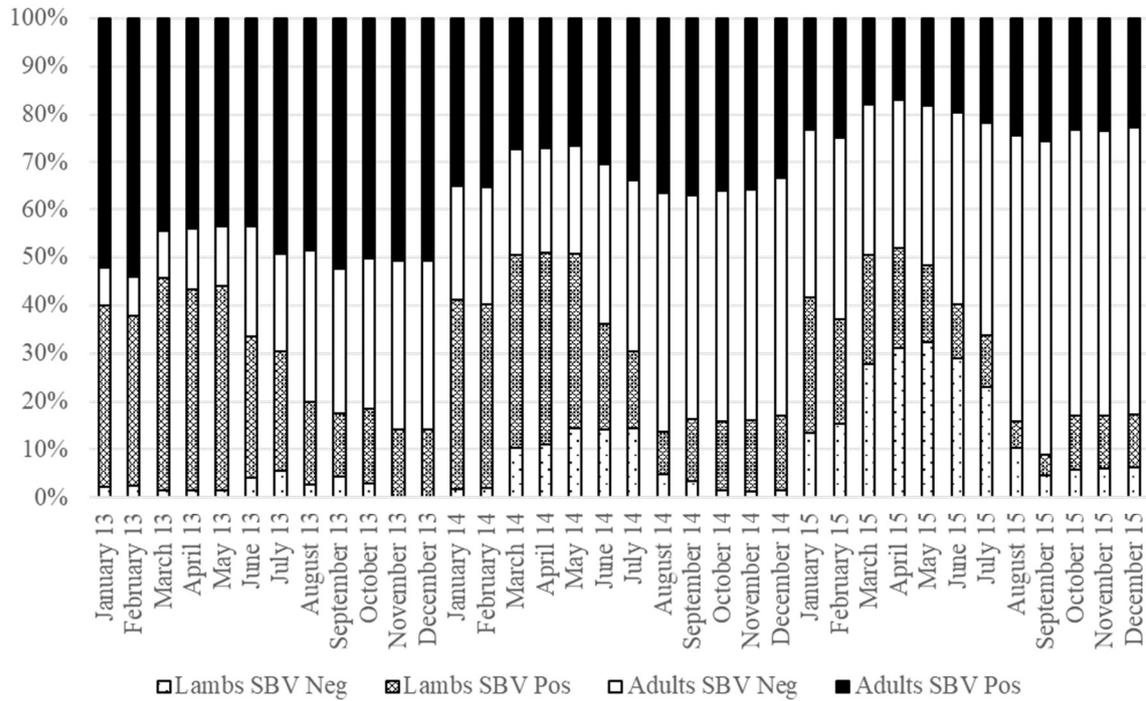
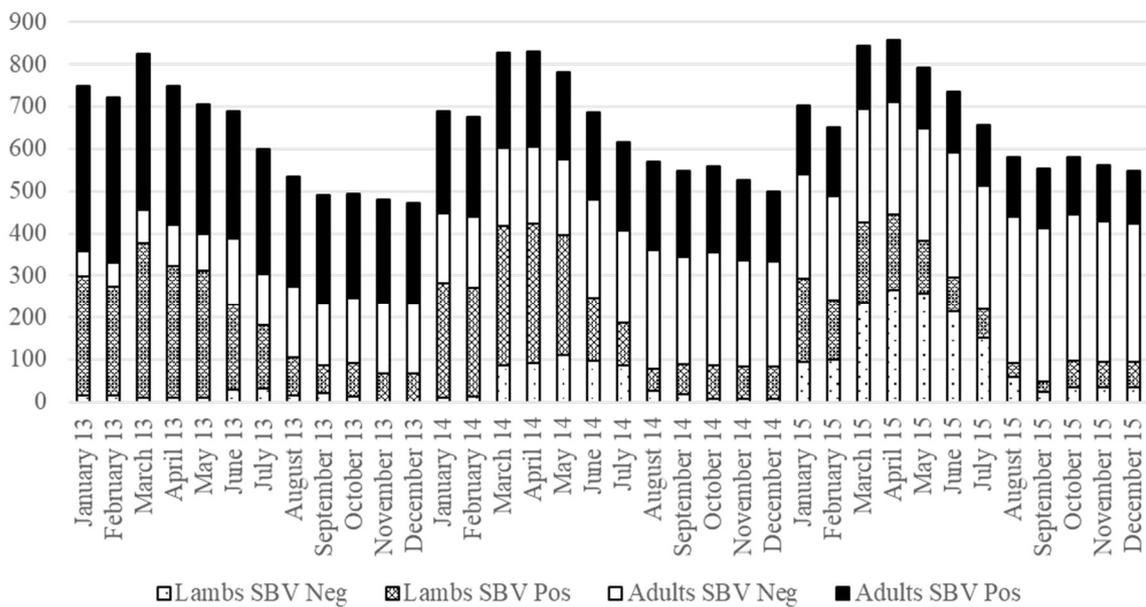
A**B**

Figure 24 : Modélisation de l'évolution du pourcentage (A) et du nombre absolu (B) d'ovins séropositifs et d'ovins séronégatifs au SBV depuis le mois de janvier 2013 jusqu'au mois de décembre 2015 au sein du troupeau du CRO, en considérant la totalité du troupeau (jeunes individus et ovins adultes) (modifié d'après Claine et al., 2018).

Ces spéculations ont été validées par un VNT réalisé sur des prélèvements sanguins opérés sur chacun des ovins du CRO au mois de décembre 2015. Les résultats du VNT ont été comparés pour chaque individu du troupeau au statut immunitaire qui lui était prédit par application du modèle développé. Une concordance importante a été constatée : 99,0% (541/547) des résultats supposés se sont vus confirmer par ceux obtenus en VNT comme l'illustre le **tableau 10**. Ceci a souligné la correcte appréciation de la durée de l'immunité colostrale et de l'immunité active en cas d'infection par le SBV dans l'espèce ovine.

Tableau 10 : Concordance des statuts sérologiques SBV estimés sur base du modèle mathématique déployé et évalués par VNT des ovins présents au CRO durant le mois de décembre 2015 (modifié d'après Claine et al., 2018)

Animaux (n=)	Statut sérologique estimé	Résultat VNT
185	positif	positif
6	négatif	positif
356	négatif	négatif
0	positif	négatif

La modification de la valeur du taux de renouvellement dans le modèle mathématique développé a permis, à hauteur de troupeau, d'estimer le temps nécessaire pour un troupeau ovine séropositif d'atteindre une séronégativité absolue et, par conséquent, un degré de sensibilité maximale à une nouvelle vague infectieuse. Dans le cas du troupeau du CRO au sein duquel le taux de renouvellement annuel toise les 24,0%, ce scénario devrait être atteint dans les 50 mois suivants le dernier épisode de circulation virale.

E. Intérêts et limites des méthodes déployées

A l'instar de ce qui avait été déployé préalablement à la phase de réémergence virale, dès le mois d'octobre 2012 et jusqu'aux prémices de la période estivale de l'année 2016, le suivi sérologique d'un troupeau d'agnelles sentinelles a été déployé afin de capter tout signe de réaction immunitaire traduisant une nouvelle confrontation au SBV. Durant la phase de suivi sérologique s'échelonnant sur plusieurs années, le groupe d'individus sentinelles n'a connu ni l'isolement du reste du troupeau ovin du CRO, ni le confinement dans une section de bâti de l'élevage ou une prairie isolée. Il a ainsi évolué dans des circonstances (habitat, pression en pathogènes) communément rencontrées par tout individu ovin hébergé et, il est donc supposable, a été soumis au même risque d'infection par le SBV.

L'absence de résurgence virale durant cette période de latence a permis d'investiguer la durée de l'immunité active chez l'ovin adulte ayant connu les deux périodes de circulation du SBV. L'observation du maintien de celle-ci sur une période de 4 ans est un élément de première importance pour la communauté scientifique dans la mesure où il apporte une réponse complémentaire à celles obtenues dans le cadre d'une infection naturelle chez le bovin, mais aussi en cas d'infection expérimentale chez l'ovin. En outre, il est en mesure de rassurer les éleveurs sur le caractère immunocompétent de leurs ovins adultes et de les informer sur le caractère non opportun d'une vaccination de la population de brebis et béliers ayant d'ores et déjà été confrontés à au moins un épisode de circulation virale. Les titres en anticorps suivis ne préjugent aucunement des résultats d'un challenge infectieux expérimental mais l'absence de tout avortement ou quelque manifestation clinique durant les campagnes d'agnelages réalisées entre le début de l'année 2013 et la période estivale de l'année 2016 traduit le fait que les titres en anticorps anti-SBV des individus séropositifs sont en mesure de limiter la résurgence virale et les infections consécutives.

Une question d'ordre méthodologique doit toutefois être soulevée : celle de l'utilisation de la même souche virale depuis l'évaluation de la période d'émergence du SBV jusqu'aux confins de ce travail de recherche pour la réalisation des VNT. Dans le cadre de l'approche d'une infection dépendante d'un virus à ARN, ceci pourrait sembler biaisé tant les capacités d'évolution de ce type de pathogène sont jugées importantes. Il apparaît cependant qu'une stabilité génétique importante est maintenue chez les arbovirus (Forrester et al., 2014). Ceux-ci doivent faire face à la nécessité de rester adaptés à deux univers cellulaires différents (cellules de mammifères et d'insectes) et subissent donc une pression de sélection intense (effet de goulot d'étranglement) (Bayrou, 2019). Plusieurs études démontrent cette stabilité génétique pour le SBV. A titre d'exemple, Wernike et al. (2015) démontrent un niveau de mutation maximum de quatre acides aminés en trois années de suivi.

Enfin, le développement d'un modèle prédictif de l'émergence virale se positionne dans une démarche proactive et prospective d'évaluation du risque à l'instar de nombreux outils de vigilance et d'alerte déployés en ligne depuis plusieurs années et accessibles aux éleveurs et vétérinaires. Le modèle mathématique ici envisagé repose sur plusieurs socles apparaissant comme presque immuables à savoir le nombre de femelles ovines en âge de reproduire, la prolificité et le taux de renouvellement. Si ces éléments présentent très peu de variations annuelles au sein du troupeau ovin du CRO, pouvant ainsi être considérés comme des constantes, il n'en est rien de bon nombre d'élevages ovins dans lesquels des fluctuations parfois importantes du nombre d'ovins détenus peuvent être constatées (accroissement de cheptel, mouvements d'animaux, étable de commerce). D'importantes oscillations de taille de population peuvent être également engendrées par des modifications des variables « prolificité » et « taux de renouvellement » à hauteur d'un élevage, résultantes de la multiplicité raciale, d'une modification de la conduite du troupeau, de la confrontation à un ou plusieurs évènements infectieux, ... A hauteur sectorielle, tout troupeau ovin ne peut se targuer

d'une décroissance quasi linéaire de sa séroprévalence intra-troupeau à l'image de celle observée au niveau du CRO.

F. Discussion

Après avoir évoqué dans le chapitre précédent l'évaluation de la persistance des anticorps colostraux dirigés contre le SBV, c'est ici un autre aspect de l'immunité qui est abordé, à savoir la durée de l'immunité active chez l'ovine adulte. L'étude ici présentée montre que l'infection naturelle par le SBV a entraîné le déploiement d'une immunité active capable de persister au moins 4 ans après l'exposition au virus. Des études menées chez le bovin laitier dans ce même objectif ont précisé que des anticorps anti-SBV étaient encore détectables au moins 24 mois après l'introduction du virus dans le troupeau (Elbers et al., 2014) voire jusque 3 ans après la phase d'infection virale (Wernike et al., 2015). Dans l'espèce ovine et dans le contexte d'une infection expérimentale, Poskin et al. (2016) a démontré la persistance immunitaire jusqu'au moins 2 ans. Ces résultats tendent ainsi à démontrer que l'immunité active de l'ovine suite à une exposition naturelle au SBV est apte à prévenir la réinfection. Est-ce pour autant une considération générique, valable à hauteur de tout individu présent dans le troupeau ? Wernike et al. (2015) a émis des réserves quant à ce point, en tout cas dans l'espèce bovine. Rodriguez-Prieto et al. (2014) a d'ailleurs insisté sur l'intérêt d'une vaccination pour contre-carrer l'hétérogénéité du degré de séroconversion et bénéficier ainsi d'une protection plus uniforme à hauteur d'une population à risque.

Depuis la fin de l'année 2012 et jusque fin de l'année 2015, nul bruit sérologique n'a été détecté au sein du groupe d'agnelles sentinelles du CRO supposant donc que la circulation du SBV était extrêmement discrète voire nulle. Cette hypothèse est confirmée par l'absence de résultats RT-qPCR positifs dans le cadre des analyses du protocole avortement et opérées par le LNR sur le territoire national (Poskin et al., 2016). Cependant, le renouvellement annuel des individus au sein des troupeaux de ruminants combiné au faible taux d'utilisation du vaccin en Belgique était supposé accroître le risque de résurgence virale (Poskin et al., 2016). Ainsi, en raison d'une augmentation progressive et annuelle de la part d'individus séronégatifs dans un

troupeau de ruminants dès sortie de la fenêtre de protection colostrale, le renouvellement du cheptel devient un élément promoteur de résurgence du SBV, à l'image de ce qui a été évalué par Kono et al. (2008) concernant le virus Akabane. Les résultats présentés dans ce chapitre à hauteur du troupeau du CRO semblent en contradiction avec ceux présentés dans l'étude de Sohier et al. (2017a) qui ne met en évidence aucune diminution de la séroprévalence du SBV dans la population ovine belge entre 2014 et 2015. Cette divergence peut s'expliquer d'une part en raison des techniques de diagnostic sérologique distinctes (ELISA versus VNT), des biais d'échantillonnage mais aussi, et enfin, le fait que la province de Namur, dans laquelle se situe le CRO, faisait partie, en 2014, de la zone géographique dans laquelle le moindre niveau de circulation du SBV avait été relevé.

L'évolution de la séroprévalence intra-troupeau décrite dans ce chapitre s'est basée sur un taux de renouvellement annuel de 24% et a projeté l'atteinte d'un niveau de séronégativité 50 mois, c'est-à-dire 4 ans environ, après le dernier épisode d'infection naturelle connu. Plusieurs éléments ont confirmé la validité de cette démarche. Tout d'abord, l'étude de Lievaart-Peterson et al. (2015) confirmant que le taux de renouvellement appliqué est similaire à celui relevé dans la plupart des exploitations à visée commerciale, autorisant ainsi à une extrapolation des résultats pressentis au secteur ovin dans son ensemble. Et, ensuite, la mise en œuvre d'une vaste collecte de sang à hauteur de l'ensemble du troupeau ovin du CRO au mois de décembre 2015 dans le but de contrôler l'adéquation entre statut sérologique supposé et statut sérologique testé par VNT. Ces éléments ont définitivement validé le modèle déployé. Enfin, face à des situations individuelles ou sectorielles divergentes à celle rencontrée au CRO concernant le renouvellement du troupeau, la modification du taux concerné au sein du modèle actualisait l'atteinte de statut séronégatif. Ainsi, à titre d'exemple, un taux de renouvellement de 14% était supposé à la séronégativité du troupeau 86 mois (7 ans) après la dernière exposition au SBV, tandis qu'un taux de renouvellement de 34% faisait descendre cette valeur à 35 mois

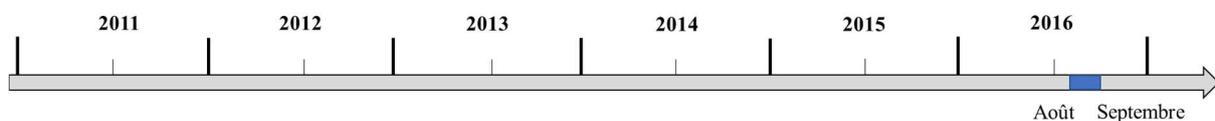
(3 ans). Comme le précise Roche et al. (2001), les élevages bovins connaissent en général des taux de renouvellement de leur population plus élevés que les troupeaux ovins. Il fallait dès lors s'attendre, selon le modèle présenté dans ce chapitre, à une résurgence plus précoce du SBV au sein de la population bovine belge après l'épisode connu en 2012. Sur base d'un taux de renouvellement légèrement supérieur à 30% dans ce secteur, l'année 2015 devait ainsi marquer un tournant épidémiologique dans l'histoire bovine belge du SBV. Ce fut en effet le cas. Comme l'ont mentionné Delooz et al. (2017), Poskin et al. (2016) et Sohler et al. (2017b), des certitudes existent quant à l'existence d'une troisième vague de circulation du SBV dès l'automne 2015 au sein de cette population. Un fœtus bovin malformé âgé de 8 mois et détecté positif en PCR en a été la preuve irréfutable. Au même moment, le suivi du groupe ovin sentinelle du CRO ne laissait entrevoir aucune stimulation antigénique.

CHAPITRE V : Episode quatrième ou nouvelle phase de circulation virale

Ce chapitre décrit et commente le quatrième épisode de l'infection naturelle au SBV connu dans le troupeau ovin du CRO à savoir la nouvelle phase de circulation virale objectivée au cours de l'année 2016. Celle-ci correspond à la troisième vague épidémique connue par ce troupeau. Les données ici présentées cherchent à répondre aux objectifs suivants :

- ✓ *A quelle période la troisième de circulation virale a-t-elle été rencontrée ?*
- ✓ *La fenêtre temporelle de résurgence du SBV en 2016 coïncide-t-elle avec les prédictions établies sur base du modèle mathématique développé ?*

Chronologiquement, les investigations décrites dans ce chapitre se sont échelonnées durant la période représentée sur la frise suivante :



Le suivi sérologique des agnelles issues du troupeau sentinelle a permis de mettre en évidence l'apparition d'une réponse humorale traduisant indirectement l'exposition au SBV. Une analyse rétrospective des échantillons sanguins par RT-qPCR a confirmé et daté ce nouvel épisode de circulation virale, le troisième connu par le troupeau ovin du CRO.

Les résultats mentionnés dans ce chapitre ont été cités dans la ressource listée ci-dessous :

- ❖ Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Modelling the evolution of Schmallenberg virus seroprevalence in a sheep flock after natural infection. *Prev Vet Med.* 2018 ;154 :132-138

A. Mise en évidence d'un nouvel épisode de circulation virale

Comme mentionné précédemment, le suivi sérologique du troupeau d'agnelles sentinelles mis en place depuis l'épisode de réexpression virale connu durant la période estivale de l'année 2012 s'est poursuivi jusqu'à l'été 2016, sans modification du nombre d'individus sentinelles et de conditions d'allotement et de renouvellement (**figure 25**).

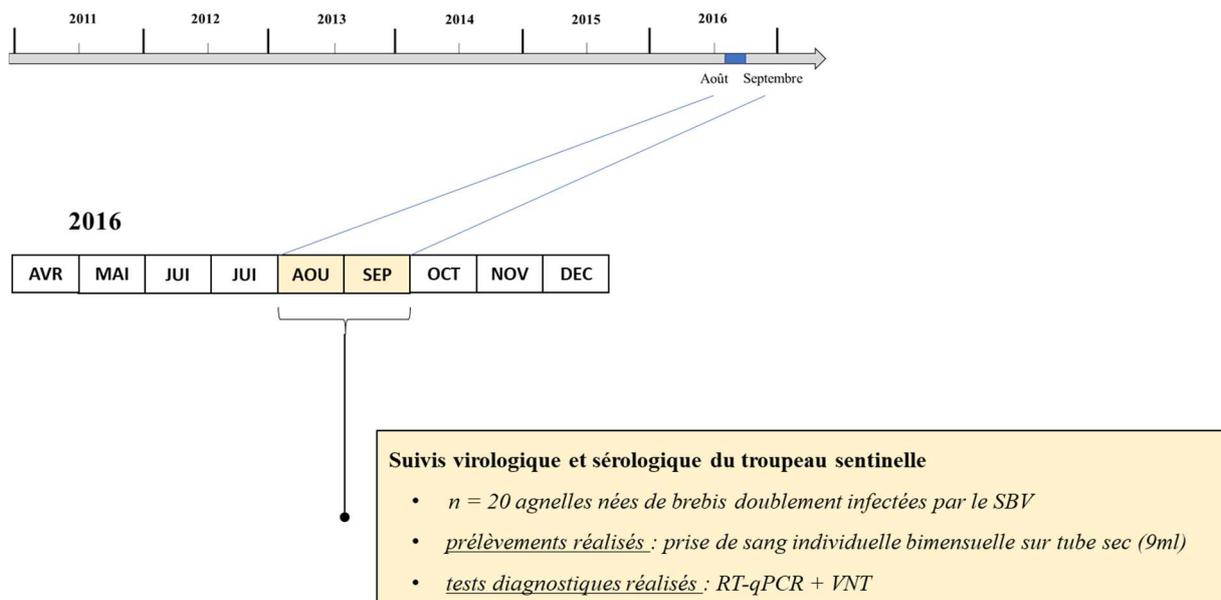


Figure 25 : Description synthétique du protocole déployé dans le cadre des suivis virologique et sérologique du troupeau sentinelle au sein du CRO entre le mois d'août 2016 et le mois de septembre 2016

Parmi ces individus sentinelles, les premiers résultats positifs obtenus par diagnostic direct (RT-qPCR) sont issus de prélèvements sanguins réalisés à la mi-août. A ce moment, 70% (14/20) des agnelles sentinelles se sont révélées positives avec une valeur de Ct médiane de 32,02 (min 26,81 et max 38,90).

A la mi-septembre, l'ensemble des agnelles du groupe sentinelle a présenté un résultat sérologique positif au VNT. La valeur médiane (min – max) des titres en anticorps anti-SBV exprimés sous forme du \log_2 ED50 était égale à 9,47 (3,49 – 10,97).

Il doit également être précisé que durant la période de monitoring, aucun signe clinique n'a été observé dans ce troupeau.

B. Validation du modèle prédictif établi

Selon le modèle mathématique dont l'élaboration a été précisée dans le chapitre précédent, le troupeau ovin du CRO, confronté à un nombre constant de femelles en âge de reproduire égal à 400 individus et un taux de renouvellement annuel égal à 24%, devait atteindre une séronégativité totale 50 mois après le dernier épisode de circulation virale. Celui-ci ayant été décrit au cours de la période estivale de l'année 2012, un nouvel épisode d'émergence du SBV pointerait logiquement 4 ans plus tard. C'est en tout point ce qui a été observé au travers du suivi sérologique des agnelles sentinelles issues du troupeau du CRO, ce qui valide la pertinence du modèle.

Tout porte donc à croire qu'entre la fin de l'année 2012 et la fin de l'année 2015, au sein de ce troupeau ovin, la circulation du SBV s'est avérée nulle ou très limitée. Une hypothèse confirmée, comme il a été précisé dans le chapitre précédent, par l'absence de résultats positifs en RT-qPCR menées sur les avortons bovins et ovins collectés dans le cadre du protocole avortement national et analysés le laboratoire national de référence (LNR) durant cette même période (Poskin et al., 2016).

C. Discussion

S'il est intéressant de constater la pertinence du modèle établi au regard du timing escompté de résurgence virale et du moment d'obtention des premiers résultats positifs en RT-qPCR au sein du groupe sentinelle du CRO, il est rassurant de constater une réelle concordance avec les observations réalisées dans les pays limitrophes. La saison 2016 peut en effet être considérée comme celle d'une nouvelle vague de circulation du SBV à l'échelle européenne (Bayrou, 2019). Sur le territoire allemand, une hausse conséquente d'animaux virémiques est constatée ainsi que des niveaux de séroprévalence équivalents à ceux connus plusieurs années auparavant (Wernike & Beer, 2017 ; Wernike et al., 2018). En France, le nombre de signalements de nouveau-nés malformés est multiplié par un facteur 10 (Gache et al., 2018). Comme le précise Bayrou (2019), l'Europe est probablement rentrée dans un cycle de réémergence de 4-5 ans comme cela est observé pour de nombreux virus phylogéniquement proches (AKAV, AINO,...). Cette cyclicité est la conséquence de la décroissance régulière de l'immunité collective dans les pays atteints. En Belgique, il est interpellant de constater que cette troisième vague de circulation virale n'a pu être tracée à hauteur du secteur ovin de manière aussi évidente au sein des laboratoires de diagnostic régionaux et nationaux.

Du côté bovin, le retour de la maladie de Schmollenberg est une évidence appuyée par l'expulsion en 2016 d'un fœtus malformé (arthrogrypose, torticolis et hydrocéphalie) de 8 mois issu d'une vache primipare de race Holstein et par l'autopsie et les examens complémentaires opérés par l'ARSIA qui ont démontré l'infection par le SBV. Sur base du type de lésions observées sur l'avorton, la date de l'infection a été estimée entre le 3 octobre et le 12 novembre 2015 (ARSIA, Rapport d'activités 2017). S'est ensuivi une augmentation du nombre de résultats PCR positifs décelés au sein des échantillons biologiques issus de troupeaux bovins wallons transmis dans le cadre du protocole avortement. Le taux de réaction positive en diagnostic direct était ainsi de 23,93% en 2017 contre 7,20% en 2016 et 0% en 2015.

Observant ensuite les résultats du même protocole avortement du côté des espèces de petits ruminants, et plus particulièrement encore le cas du secteur ovin, il est étonnant de constater, alors qu'une troisième phase de circulation virale est clairement démontrée au sein du CRO, que le taux de réaction positive au SBV au sein des tests diagnostiques déployés à l'échelon régional et à l'échelon national demeure nul entre 2013 et 2017. Faut-il y dès lors rapprocher le cas du CRO comme un fait inédit, à valeur tout-à-fait particulière à hauteur du secteur ovin wallon ? Un regard sur les données présentées par l'ARSIA dans ses rapports d'activités (2014-2017) permet de mieux appréhender cette apparente discordance.

Durant la saison hivernale 2012, l'émergence du SBV a eu un effet sensibilisateur auprès des éleveurs ovins et caprins sur la nécessité de déclarer les avortements rencontrés. Ainsi, un total de 140 avortements a été déclaré en 2012 (120 ovins et 20 caprins). L'année suivante, le nombre absolu de déclarations d'avortement a été divisé par 6. Cette tendance s'est maintenue durant les saisons suivantes. L'augmentation des déclarations d'avortement observée en 2012 était donc un phénomène exceptionnel. Sur base des informations relatives aux commandes de boucles réalisées en 2017, l'ARSIA a estimé respectivement à 764 et 77, le nombre d'exploitations ovines et caprines où au minimum un cas d'avortement aurait statistiquement dû survenir au cours des 12 derniers mois. Seuls 51 déclarations ont eu lieu en 2017. C'est dire à quel point les éleveurs ovins soit méconnaissent, soit ne respectent sciemment pas l'obligation de déclarer les avortements observés dans leur troupeau (ARSIA, Rapport d'activités 2017). La sensibilisation du secteur semble donc nécessaire, certes afin de respecter une obligation légale, mais aussi afin de mieux appréhender la dynamique de circulation des pathologies des ruminants et informer les éleveurs sur les pathogènes évoluant dans leur troupeau. Il est essentiel de garder à l'esprit que bon nombre d'agents abortifs sont zoonotiques et peuvent *ipse facto* impacter directement l'état de santé des individus humains évoluant à proximité du bétail.

DISCUSSION GENERALE

L'approche déployée au cours de ce travail de description des différentes étapes de l'infection naturelle au SBV du troupeau ovin du CRO a permis de mettre en exergue les éléments-clés successifs suivants :

- une **période d'émergence virale** au cours des mois de septembre et d'octobre de l'année 2011 ayant pour conséquence une infection transplacentaire des ovins femelles en gestation durant cette fenêtre temporelle. Cette infection verticale s'est traduite dans les mois qui ont suivi par (1) l'observation d'un tableau lésionnel marqué par le syndrome AG-HE (campagne d'agnelages de janvier 2012) et des avortements (campagne d'agnelages de mars 2012) marquant ainsi la variabilité de la symptomatologie selon le stade de gestation durant lequel l'infection a lieu et la réponse, et (2) une séroprévalence intra-troupeau égale à 98,8% (417/422) signant la hauteur de la réponse humorale déployée.

- une **période de réexpression virale** entre le mois de juillet et le mois d'octobre 2012, dont l'étendue temporelle s'est révélée plus importante que la période d'émergence, mais dont l'impact lésionnel au niveau du troupeau s'est illustré comme nettement moindre. De rares cas d'avortement et d'arthrogrypose ont été décelés durant le 1^{er} quadrimestre de l'année 2013. Cette période de réexpression virale a, quant à elle, dégagé un effet booster sur l'immunité humorale du troupeau. Ceci s'est observé tant au niveau du taux d'anticorps circulants chez l'ovin adulte qu'au niveau du colostrum et de la durée de l'immunité passive chez l'agneau né de mère doublement infectée.

- une **période de latence** qui a suivi la phase de réexpression et ce jusqu'au mois d'août de l'année 2016 correspondant à une absence de manifestation sérologique traduisant un nouvel épisode de circulation virale au sein du groupe d'ovins sentinelles.

- une **troisième phase de circulation virale**, enfin, rencontrée entre le mois d'août et le mois de septembre 2016, tel que prédite par le modèle mathématique élaboré au cours de ce

travail estimant le retour à une séronégativité progressive du troupeau en raison du taux de renouvellement annuel appliqué.

De la description de l'impact de l'infection naturelle du SBV dans le troupeau ovin du CRO ressortent quelques éléments manquants ou faits d'actualité permettant de clore l'histoire et/ou de la positionner dans un contexte plus large. Ceux-ci seront développés ci-après.

A. Culicoïdes : le chaînon manquant

De cette histoire qui se focalise au fil des chapitres sur l'élément ovin, manque inévitablement l'approche de l'organisme vecteur dont la caractérisation et le suivi de la dynamique de population au cours des différentes phases de circulation virale semblent constituer un des parallélismes des plus intéressants. Si les culicoïdes n'ont volontairement pas fait l'objet d'une approche spécifiquement dédiée dans ce travail de thèse, il n'en reste pas moins que leur population a été suivie et caractérisée au travers de tests de densité et de diversité au sein du CRO par plusieurs étudiants de Master en Sciences biologiques dans le cadre de leur mémoire. Des échantillonnages réguliers ont été ainsi mis en place au moyen de pièges de type OVI dispersés dans les bergeries et dans les parcelles pâturées par les ovins au cours des années 2013, 2014 et 2015.

Le suivi des populations de culicoïdes au sein du CRO a démontré, sur base d'un triage selon leur statut physiologique, une émergence des diptères à la jonction des périodes printanière et estivale (nombre élevé de nullipares), suivie durant le plein été d'une forte présence de formes pares et, enfin, l'augmentation du nombre d'individus gravides à la jonction des périodes estivale et automnale. Une évolution se superposant de manière harmonieuse avec les fenêtres de temps décrites précédemment comme des phases d'émergence et de réémergence virales, et donc d'activité de recherche d'hôtes par les culicoïdes adultes. Aucun lien n'a cependant pu être mis en évidence entre la densité, les températures minimales et maximales,

l'humidité relative et la proportion de culicoïdes piégés. En outre, comme le soulignait Wernike et al. (2013) ou encore Mehlhorn et al. (2009) dans leurs études respectives, des culicoïdes actifs sont bel et bien retrouvés en période hivernale, et ce essentiellement en bergerie. Enfin, les tests de diversité ont démontré la présence d'une plus grande variété d'espèces de culicoïdes dans les échantillonnages opérés à proximité de milieux aquatiques ou semi-aquatiques.

Si l'effet « saison » semble clair sur l'abondance des statuts physiologiques des culicoïdes circulants, et donc inéluctablement sur la période susceptible d'être jugée comme « à risque » en terme de transmission d'un agent pathogène tel le SBV, la question de l'impact des bouleversements climatiques sur l'étendue de celle-ci se dresse inévitablement. Comme le mentionnent Lafferty et al. (2009) ainsi que Purse et al. (2015), les phases de circulation des arbovirus sont intimement liées à l'abondance saisonnière des populations d'arthropodes vecteurs et l'influence du climat sur leur distribution et leur dynamique pose de réelles interrogations. Purse et al. (2015) précisent d'ailleurs que, parmi ces arthropodes vecteurs, les culicoïdes semblent les plus prompts à être affectés par des éléments telle la température ou la pluviométrie. L'étude de Sanders et al. (2019) révèle des éléments d'intérêt premier à cet égard. Elle démontre en effet que des changements significatifs ont été relevés dans les dates d'apparition et de disparition des populations de culicoïdes adultes sur le territoire britannique ces dernières années que seule une modification de facteurs climatiques est susceptible d'expliquer. Ainsi, un accroissement de l'abondance des culicoïdes et un allongement de la période d'activité de vol des formes adultes ont été constatés, augmentant *de facto* la probabilité de transmission de pathogènes tels les arbovirus et la capacité d'hivernage des diptères. Des températures plus douces en arrière-saison pourraient en effet promouvoir la survie de culicoïdes adultes et le risque de transmission virale en conditions hivernales (Sarvasova et al., 2016).

B. SBV et BTV : un parallélisme évident

Evoquer les culicoïdes, en tant qu'organismes vecteurs, ne peut se limiter au seul cas du SBV. Quelques années plus tôt, ces diptères avaient déjà fait parler d'eux dans le cadre d'une autre épidémie : celle du BTV ou maladie de la langue bleue. A côté de cette première caractéristique commune que d'être propagés par le même hôte vectoriel, de nombreuses autres similitudes peuvent être décelées entre le SBV et le BTV, et ce même s'il est vrai qu'ils appartiennent tous deux à des genres viraux totalement distincts. Ces entités virales sont toutes deux des virus à ARN ciblant principalement les ruminants. Le SBV est apparu 5 ans après la fin de la phase de circulation du BTV, et plus particulièrement son sérotype 8 (BTV-8), dans les pays du Nord de l'Europe (Allemagne, Pays-Bas et Belgique) avant de connaître une expansion européenne extrêmement rapide (Saegerman et al., 2010). *A contrario*, la dispersion du BTV-8 s'est révélée temporellement plus lente et géographiquement bien plus limitée. Une hypothèse retenue pour expliquer cette variation est l'établissement de mesures de restriction des mouvements d'animaux imposées en Europe lors de l'émergence du BTV, et ce en lien direct avec le caractère extrêmement aigu du tableau clinique présenté par les individus infectés. De son côté, l'émergence du SBV, caractérisée par une infection essentiellement subclinique n'a pas engendré de telles mesures. De manière complémentaire, des dissonances de dissémination vectorielle entre ces pathogènes ont été constatées sur base de la probabilité de transmission de l'hôte au vecteur et du taux de répllication virale (Gubbins et al., 2014). Ainsi, la probabilité de transmission du SBV de l'hôte au vecteur a été estimée à 14% contre 1% pour le BTV. En termes de répllication, le SBV dispose d'une température seuil de répllication plus basse et d'une vitesse de répllication plus élevée que le BTV (Gubbins et al., 2014). Alors que le taux reproductif de base (R_0) du SBV est ainsi estimé à 6,2 pour les exploitations bovines et 7,6 pour les exploitations ovines, il frôle les 3,8 dans le secteur bovin et le 3,4 dans le secteur ovin (Gubbins et al., 2014). Il a en outre été démontré que les distances moyennes entre les

foyers infectieux et les foyers infectés étaient plus courtes pour le BTV-8 que pour le SBV (Sedda et al., 2013). L'impact des conditions météorologiques, il faut le préciser, et plus particulièrement des courants aériens, sur la dispersion des culicoïdes (et donc de ces virus) est majeur. Cet élément est d'ailleurs mis en avant pour expliquer l'introduction du SBV sur des territoires aliens à l'instar des îles britanniques et de l'Irlande depuis le continent avec des dispersions géographiques clairement dépendantes des vents locaux (Bayrou, 2019). L'effet vent peut ainsi participer à des disonances de dispersion entre BTV et SBV à quelques années de décalage. A l'échelle d'un troupeau comme d'un secteur d'élevage tout entier, le SBV s'est donc répandu bien plus rapidement que ne le fit le BTV quelques années plus tôt, déployant un taux de séroprévalence intra-troupeau significativement supérieur (Elbers et al., 2012).

Au rang des similitudes, comme mentionné plus haut, se range celle des voies de transmission : ces deux virus sont en effet propagés par les moucheron du genre *Culicoides* spp. et la voie de transmission transplacentaire est décrite pour chacun d'entre eux (Leemans et al., 2013). Du côté du BTV-8, les possibilités de transmission par placentophagie et par voie sexuelle ont été établies (Menziés et al., 2008). Si les signes cliniques associés à l'infection par le SBV chez l'individu bovin ou ovin adulte sont plutôt discrets tel que mentionné plus haut, il apparaît que l'infection du mouton par le BTV-8 est à l'origine d'un tableau clinique particulièrement aigu. Ainsi, une congestion de la tête associée à une salivation excessive et une ulcération des muqueuses ont été fréquemment observées. Les conséquences d'une infection pendant la gestation peuvent consister en l'avortement de l'animal gestant ou l'observation de désordres neurologiques sont observés chez l'individu mort-né ou nouveau-né. Pendant l'épidémie de BTV-8, une augmentation significative du nombre d'avortements et du nombre d'individus mort-nés a été recensée dans le secteur bovin ainsi qu'un accroissement des naissances de veaux jugés faibles ou présentant des désordres neurologiques. La dénomination anglophone « dummy syndrom » a été utilisée pour décrire ceux-ci tant dans

l'espèce bovine que dans l'espèce ovine (Saegerman et al., 2011). Des troubles développementaux du SNC y ont été associés telle l'hydranencéphalie (Vercauteren et al., 2008). De telles anomalies ont été détectées chez les individus mort-nés ou nouveau-nés de ruminants en cas d'infection par le SBV, mais dans ce présent cas, elles ont été systématiquement associées à des déformations squelettiques et/ou désordres musculaires tels l'arthrogrypose, la scoliose, la lordose et/ou le torticolis.

A l'instar des éléments déployés dans le cadre du diagnostic de l'infection par le SBV, la démarche la plus communément utilisée pour l'identification d'une infection à BTV-8 est celle de la détection du génome par RT-PCR et/ou l'évaluation de la réponse immunitaire humorale par ELISA ou VNT. Comme pour le SBV, de nombreuses espèces de mammifères ont été détectées BTV positives mais, en l'absence de résultats PCR positifs, il n'a pu être conclu que ces espèces devaient être considérées comme de réels hôtes du virus.

Tant pour le BTV que pour le SBV, la vaccination des troupeaux est apparue comme « la » mesure préventive capable de prévenir un nouvel épisode de circulation virale (Leemans et al., 2013). Si d'importantes campagnes de vaccination contre le BTV ont été promues et entreprises sur le territoire nord européen, l'usage de la vaccination contre le SBV s'est révélé quant à lui bien plus limité. Que ce soit pour le BTV comme pour le SBV, la surveillance des pathogènes au sein des populations vectorielles a été présenté comme l'élément de monitoring de circulation virale le plus pertinent.

Enfin, il est clair que l'impact de l'infection par le BTV sur la santé et la productivité des troupeaux de ruminants s'est révélé plus important que celui lié à l'infection par le SBV. Un tableau clinique pouvant être qualifié de sévère, des taux de morbidité et de mortalité élevés, un impact négatif sur la qualité de la semence des taureaux et béliers et sur les performances de reproduction des femelles ont clairement hissé le BTV au rang des pathogènes majeurs

rencontrés ces dernières années dans les troupeaux de ruminants (Kirschvink et al., 2009 ; Muller et al., 2010 ; Saegerman et al., 2011).

C. SBV, une histoire qui s'écrit au présent ?

Le peu de mesures prophylactiques déployées à hauteur sectorielle pour se prémunir contre l'infection par le SBV, la difficulté de prévenir la transmission par les populations vectorielles, le renouvellement annuel du cheptel, ... sont autant de facteurs susceptibles de laisser ouvertes les portes à de réguliers épisodes de circulation virale. Ce postulat n'est pas neuf : Kirkland et al. (2015) évoquent, dans le cas d'un autre arbovirus, AKAV, ce phénomène de résurgences épisodiques associées à une augmentation du nombre de cas de malformations congénitales. Si, comme il a été indiqué antérieurement, le taux de réaction positive au SBV au sein des tests diagnostiques déployés à l'échelon régional et à l'échelon national est demeuré nul entre 2013 et 2017 dans la population ovine, il faut certainement y voir un impact du faible taux de participation des éleveurs aux initiatives visant à identifier le(s) pathogène(s) responsable(s) d'avortement.

Depuis 2017, le nombre de déclarations d'avortement va cependant croissant. Les 110 avortements recensés en 2021 pour le secteur des petits ruminants représentent ainsi une augmentation de plus de 500% du nombre de déclarations en 10 ans (ARSIA, Rapport d'activités 2021). Dans les chiffres présentés par l'ARSIA et issus des résultats du protocole avortement déployé dans le secteur ovin, il est fort intéressant de constater également l'évolution croissante du nombre de résultats PCR positifs au SBV sur les biopsies de placenta et/ou de fœti transmis entre 2018 et 2021. Ainsi, les taux de réaction positive ont évolué de 0% en 2018, à 3,77% en 2019, 37,50% en 2020 et 60,00% en 2021 pour un nombre annuel de déclarations égal à 43, 37, 70 et 68 respectivement. Ces résultats démontrent le caractère tout-à-fait contemporain de la circulation du SBV dans notre cheptel ovin wallon. Faut-il voir

derrière cette évolution croissante un signe clair de nouvelle vague épidémique ? L'application du modèle mathématique développé dans le cadre de ce travail est tentante : sur base de l'observation théorique de vagues de résurgence à intervalles de 4 ans, la dernière phase de circulation connue en 2016 devait être suivie par une nouvelle flambée de cas de SBV durant la campagne 2020-2021. Est-ce dès lors le fruit du hasard ? Certains prétendront à juste titre qu'à tester davantage, plus grande sera la probabilité de détecter des cas positifs. A cela d'autres de répondre que l'augmentation du nombre de déclarations d'avortement peut intimement être liée une augmentation inattendue de cas de malformations congénitales, dont le caractère frappant a motivé la démarche diagnostique.

L'ensemble des éléments pouvant être qualifiés de fluctuations virales présentés dans ce travail au sujet de la situation connue par le CRO mais également des informations rapportées issues de pays voisins tendent à démontrer le caractère endémique du SBV sur nos territoires dont des vagues de circulation seront régulièrement observées concomitamment avec une augmentation du nombre d'individus séropositifs dans les troupeaux. La variabilité de conduite entre espèces de ruminants (taux de réforme, prolificité,...) expliquera les écarts temporels entre pulsations endémiques observées.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Ce travail de thèse se veut écho d'une histoire individuellement rencontrée par le troupeau ovin du CRO de l'UNamur. Au travers des investigations réalisées, il a tantôt confirmé voire précisé ce que d'autres équipes avaient pu observer en d'autres temps et d'autres lieux. Il a tenté également d'apporter sa modeste contribution aux connaissances sur l'infection au SBV et ses impacts dans l'espèce ovine. L'écart temporel entre les phases d'observation et d'investigation *in situ* et la rédaction de ce tapuscrit a permis de bénéficier du recul nécessaire pour mettre en lumière toute l'insignifiance d'une telle démarche descriptive quand celle-ci se révèle individuelle. Tenter l'expérience de passer *a posteriori* d'une vue « troupeau » à une vue « cheptel », a démontré la dimension lacunaire de la surveillance sanitaire et de l'acquisition de données épidémiologiques au sein du secteur ovin wallon, et plus globalement du secteur ovin belge. Et pourtant, l'expérience démontre que c'est la constitution d'un maillage opérant entre éleveurs, vétérinaires praticiens, laboratoires de diagnostic et autorités régionales comme fédérales qui, seule, est susceptible de gommer ses gaps informationnels.

Le secteur de l'élevage ovin ferait-il figure de milieu réfractaire à la démarche diagnostique et aux initiatives des autorités visant à motiver celle-ci ? Les données de participation de ce secteur au dénommé « protocole avortement », telles que présentées dans ce travail, sont éloquentes. L'ARSIA estime ainsi que seuls 2% des avortons et agneaux mort-nés de moins de 48h font l'objet d'une déclaration officielle dans le cadre de ce protocole avortement. Rappelons d'une part qu'il s'agit d'une démarche obligatoire dont les modalités sont édictées par l'Arrêté Royal du 22/05/2014 fixant les mesures de collecte des commémoratifs, de réalisation et d'analyse de prélèvements d'échantillons biologiques faisant suite à un avortement dans les espèces bovine, ovine et caprine en Belgique. Signalons d'autre part que le coût des analyses opérées dans le cadre du dit protocole par les laboratoires

régionaux et le LNR est entièrement pris en charge par les autorités. S'agit-il dès lors d'une volonté de taire l'évènement abortif, d'une crainte de mise en place de mesures de biosécurité imposées ou tout simplement d'une méconnaissance des éléments législatifs et des démarches diagnostiques proposées ?

Au recensement hivernal réalisé au mois de décembre 2021, le secteur ovin affichait un total de 7892 troupeaux connus sur le territoire de la Région Wallonne, contre 3450 troupeaux caprins et 9430 troupeaux bovins. Alors que l'élevage du mouton et celui de la chèvre ne font nullement figures d'élevage de tradition sur le sol belge au même titre que l'élevage bovin, voici que le nombre de troupeaux de petits ruminants a dépassé le nombre de troupeaux bovins. Et la tendance risque de se confirmer dans les prochaines années au regard de l'érosion continue du secteur bovin wallon face à l'essor des élevages ovins et caprins. Les raisons de cet élan sont nombreuses sans avoir fait pourtant l'objet d'une étude précise par nos autorités : diversification de l'activité agricole, reconversion professionnelle vers un secteur d'élevage jugé d'abord plus aisé, développement d'une activité professionnelle complémentaire, lancement d'un plan de soutien de l'élevage ovin financé par la RW, ... Mais ce sont là des éléments cantonnés aux quelques dizaines d'éleveurs devant être considérés comme professionnels ou souhaitant le devenir. Car si le secteur a le vent en poupe et attire toujours plus de candidats éleveurs, la typologie de ceux-ci reste malgré tout majoritairement orientée vers un profil hobbyiste. Septante-neuf pourcents des troupeaux ovins wallons sont constitués de 1 à 10 individus. C'est dire si le mouton d'entretien de parcelle fait figure de dominant. Et derrière cet ovin « de compagnie », se retrouvent bien plus de détenteurs que d'éleveurs. Une enquête portant sur la gestion des avortements menée en 2019 par l'ARSIA et la Faculté de Médecine Vétérinaire (FMV) de l'Université de Liège (ULiège) auprès des éleveurs ovins apporte un éclairage édifiant. Sur les 70 éleveurs répondants à cette enquête, et dont la distribution des profils était similaire à celle du secteur à savoir majoritairement orientée vers

le détenteur hobbyiste, plus de la moitié précisait ne jamais avoir fait appel à leur vétérinaire face à un épisode abortif. Septante-cinq pourcents des répondants mentionnaient ne pas connaître les démarches à effectuer pour notifier un avortement et pour bénéficier des analyses réalisées par les laboratoires régionaux et le LNR. En outre, près de 3 répondants sur 4 faisaient part de leur intérêt pour disposer de plus amples informations sur les pathogènes responsables d'avortement dans l'espèce ovine. Élément complémentaire enfin, apporté par le rapport d'activités publié par l'ARSIA en 2021 : le taux de participation au protocole avortement selon la taille de troupeau évaluée sur base du nombre de femelles de plus de 6 mois recensées. Celui-ci est égal 1,75% pour les troupeaux comptant 1 à 20 individus, 13,25% pour les troupeaux de 20 à 100 individus et de 37,69% pour les troupeaux de plus de 100 individus. Le taux de participation croît ainsi avec la taille du troupeau, démontrant si ce n'est une plus grande motivation au moins une connaissance réelle des initiatives diagnostiques par des élevages pouvant être qualifiés de professionnels. La marge de progression est donc colossale dans un secteur où l'information délivrée par les autorités fédérales et associations régionales peine à se frayer un chemin, au même titre que le vétérinaire praticien, dans les strates badgées d'amateurisme.

Cet effort de communication est pourtant une nécessité car la connaissance des menaces et désordres sanitaires pesant sur un secteur d'élevage passe inévitablement par une prise de conscience et par un dynamisme communautaires. D'autant plus, cela dit en passant, lorsqu'il s'agit d'agents pathogènes au caractère zoonotique à l'instar de *Coxiella*, *Brucella* ou encore *Chlamydia*. Ajoutons à cela l'indispensable renforcement des mesures de traçabilité des mouvements dans le secteur ovin. Ici encore, si les éleveurs professionnels semblent bel et bien au fait des demandes fédérales en la matière, nombre d'ovins s'échangent, se louent, se vendent dans la pénombre la plus totale, créant inéluctablement des dérives de surveillance sanitaire. Au regard de l'essor du secteur ovin, au vu de l'efficacité des mesures de gestion de santé et de

traçabilité prises *in illo tempore* dans d'autres filières de production (bovine, porcine, avicole), l'engagement semble urgent. Un défi à relever dans un milieu ovin où se mêlent particuliers et professionnels, moutons de compagnie et moutons de production mais au sein duquel la maîtrise du « risque » est une valeur à partager. C'est sans doute en cela que réside le paradoxe ovin.

Références bibliographiques

- Abi-Rizk A, Kanaan T, El Hage J. Seroprevalence of Schmallerberg virus and other Simbu group viruses among the Lebanese sheep. *Open Vet J.* 2017;7(3):290–293
- Afonso A, Abrahantes JC, Conraths F, et al. The Schmallerberg virus epidemic in Europe 2011–2013. *Prev Vet Med.* 2014;116(4):391–403
- Association Régionale de Santé et d'Identification Animales [homepage on the Internet]. Rapport d'activités 2014. Available from: <https://www.arsia.be/rapport-dactivites>. Accessed October 10, 2022
- Association Régionale de Santé et d'Identification Animales [homepage on the Internet]. Rapport d'activités 2015. Available from: <https://www.arsia.be/rapport-dactivites>. Accessed October 10, 2022
- Association Régionale de Santé et d'Identification Animales [homepage on the Internet]. Rapport d'activités 2016. Available from: <https://www.arsia.be/rapport-dactivites>. Accessed October 10, 2022
- Association Régionale de Santé et d'Identification Animales [homepage on the Internet]. Rapport d'activités 2017. Available from: <https://www.arsia.be/rapport-dactivites>. Accessed October 10, 2022
- Association Régionale de Santé et d'Identification Animales [homepage on the Internet]. Rapport d'activités 2018. Available from: <https://www.arsia.be/rapport-dactivites>. Accessed October 10, 2022
- Association Régionale de Santé et d'Identification Animales [homepage on the Internet]. Rapport d'activités 2019. Available from: <https://www.arsia.be/rapport-dactivites>. Accessed October 10, 2022
- Association Régionale de Santé et d'Identification Animales [homepage on the Internet]. Rapport d'activités 2020. Available from: <https://www.arsia.be/rapport-dactivites>. Accessed October 10, 2022
- Association Régionale de Santé et d'Identification Animales [homepage on the Internet]. Rapport d'activités 2021. Available from: <https://www.arsia.be/rapport-dactivites>. Accessed October 10, 2022
- Azkur AK, Albayrak H, Risvanli A, Pestil Z, Ozan E, Yılmaz O, Tonbak S, Cavunt A, Kadı H, Macun HC, Acar D, Özenç E, Alparslan S, Bulut H. Antibodies to Schmallerberg virus in domestic livestock in Turkey. *Trop Anim Health Prod.* 2013;45(8):1825-1828
- Balenghien T, Pagès N, Goffredo M, Carpenter S, Augot D, Jacquier E, et al. The emergence of Schmallerberg virus across Culicoides communities and ecosystems in Europe. *Prev Vet Med.* 2014;116(4):360–369
- Barrett D, O'Neill R, Sammin D, Clegg TA, More SJ. The impact of infection with Schmallerberg virus on weaning rate in Irish sheep flocks. *Prev Vet Med.* 2015;122(3):332–338

- Bayrou C, Garigliany MM, Sarlet M, Sartelet A, Cassart D, Desmecht D. Natural intrauterine infection with Schmallenberg virus in malformed newborn calves. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(8):1327–1330
- Bayrou C. Contribution à la biologie du virus de Schmallenberg chez les ruminants. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Vétérinaires. Université de Liège. Année académique 2019-2020
- Bilk S, Schulze C, Fischer M, Beer M, Hlinak A, Hoffmann B. Organ distribution of Schmallenberg virus RNA in malformed newborns. *Vet Microbiol.* 2012;159(1–2):236–238
- Boseret G, Claine F, Coupeau D, Muylkens B, Saegerman C, Chantraine F, Kirschvink N. In utero infection by Schmallenberg virus induces arthrogryposis multiplex congenita in ovine fetuses. Multidisciplinary Gynecology Congress, Paris, 2014 (poster)
- Bréard E, Lara E, Comtet L, et al. Validation of a commercially available indirect elisa using a nucleocapside recombinant protein for detection of Schmallenberg virus antibodies. *PLoS One.* 2013;8(1):e53446
- Burgin LE, Gloster J, Sanders C, Mellor PS, Gubbins S, Carpenter S. Investigating incursions of bluetongue virus using a model of long-distance *Culicoides* biting midge dispersal. *Transbound Emerg Dis.* 2013;60(3):263–272
- Carpenter S, Mellor PS, Torr SJ. Control techniques for *Culicoides* biting midges and their application in the UK and northwestern Palaearctic. *Med Vet Entomol.* 2008;22(3):175–187
- Cifuentes-Muñoz N, Salazar-Quiroz N, Tischler ND. Hantavirus Gn and Gc envelope glycoproteins: key structural units for virus cell entry and virus assembly. *Viruses.* 2014;6(4):1801-1822
- Claine F, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Evaluation of colostrum antibody protection in lambs born from ewes infected with Schmallenberg virus during pregnancy. Autumn Meeting of the Belgian Society of Physiology and Pharmacology, Brussel, 2012 (poster)
- Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Emergence and time course of spreading of Schmallenberg virus in late summer 2011 in a Belgian naïve sheep flock. EPIZONE Congress, Brussels, 2013 (présentation orale)
- Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Evidences for re-emergence of Schmallenberg virus during summer and autumn 2012 among naïve female lambs and immunized ewes. EPIZONE Congress, Brussels, 2013 (présentation orale)
- Claine F, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Decay of colostrum antibodies in lambs born from ewes naturally infected by Schmallenberg virus. International Veterinary Immunology Symposium, Milano, 2013 (poster)
- Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Schmallenberg virus among female lambs, Belgium, 2012. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(7):1115–1117

- Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Long-term immunity against Schmallenberg virus in sheep after natural infection. EPIZONE Congress, Copenhagen, 2014 (poster)
- Claine F, Heckel J, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Passive immunity against Schmallenberg virus in lambs born from naturally infected ewes. EPIZONE Congress, Copenhagen, 2014 (poster)
- Claine F, Prevot C, Wiggers L, Coupeau D, Muylkens B, Kirschvink N. Schmallenberg virus in sheep: evolution of flock susceptibility over years. SVEPM Annual Conference, Ghent, 2015 (présentation orale)
- Claine F, Wiggers L, Coupeau D, Muylkens B, Kirschvink N. Evolution of Schmallenberg virus seropositivity over years among sheep naturally infected at different ages. EPIZONE Congress, Montpellier, 2015 (présentation orale)
- Claine F, Wiggers L, Coupeau D, Muylkens B, Kirschvink N. Is flock renewal a risk for novel Schmallenberg virus episode in sheep flocks. EPIZONE Congress, Montpellier, 2015 (présentation orale)
- Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Schmallenberg virus infection of ruminants: challenges and opportunities for veterinarians. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. 2015;6:261-272
- Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Schmallenberg virus infection in sheep: a model of within-herd seroprevalence evolution. AESA International Conference, Liège, 2016 (présentation orale)
- Claine F, Wiggers L, Coupeau D, Muylkens B, Kirschvink N. Modelized evolution of Schmallenberg virus seroprevalence in a sheep flock. World Buiatrics Congress, Dublin, 2016 (poster)
- Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Modelling the evolution of Schmallenberg virus seroprevalence in a sheep flock after natural infection. *Prev Vet Med*. 2018;154:132-138
- Collins Á, Grant J, Barrett D, Doherty M, Hallinan A, Mee J. Schmallenberg virus: Predicting within-herd seroprevalence using bulk-tank milk antibody titres and exploring individual animal antibody titres using empirical distribution functions (EDF). *Prev Vet Med*. 2017;143:68–78
- Collins ÁB, Barrett D, Doherty ML, Larska M, Mee JF. Post-epidemic Schmallenberg virus circulation: parallel bovine serological and *Culicoides* virological surveillance studies in Ireland. *BMC Vet Res*. 2016;12(1):234
- Collins ÁB, Doherty ML, Barrett DJ, Mee JF. Schmallenberg virus: a systematic international literature review (2011-2019) from an Irish perspective. *Ir Vet J*. 2019;72:9
- Conraths FJ, Kamer D, Teske K, Hoffmann B, Mettenleiter TC, Beer M. Reemerging Schmallenberg virus infections, Germany, 2012. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(3):513–514
- Coupeau D, Claine F, Wiggers L, Kirschvink N, Muylkens B. In vivo and in vitro identification of a hypervariable region in Schmallenberg virus. *J Gen Virol*. 2013;94(6):1168–1174

- Coupeau D, Bayrou C, Baillieux P, Marichal A, Lenaerts AC, Caty C, Wiggers L, Kirschvink N, Desmecht D, Muylkens B. Host-dependence of in vitro reassortment dynamics among the Sathuperi and Shamonda Simbuviruses. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):381-395
- Daly JM, King B, Tarlinton R, Gough KC, Maddison BC, Blowey R. Comparison of Schmallerberg virus antibody levels detected in milk and serum from individual cows. *BMC Vet Res.* 2015;11(1):56
- De Regge N, Deblauwe I, De Deken R, et al. Detection of Schmallerberg virus in different *Culicoides* spp. by real-time RT-PCR. *Transbound Emerg Dis.* 2012;59(6):471–475
- De Regge N, van den Berg T, Georges L, Cay B. Diagnosis of Schmallerberg virus infection in malformed lambs and calves and first indications for virus clearance in the fetus. *Vet Microbiol.* 2013;162(2–4):595–600
- De Regge N, Madder M, Deblauwe I, et al. Schmallerberg virus circulation in *Culicoides* in Belgium in 2012: field validation of a real time RT-PCR approach to assess virus replication and dissemination in midges. *PLoS One.* 2014;9(1):e87005
- De Regge N. Akabane, Aino and Schmallerberg virus-where do we stand and what do we know about the role of domestic ruminant hosts and *Culicoides* vectors in virus transmission and overwintering? *Curr Opin Virol.* 2017;27:15–30
- Delooz L, Saegerman C, Quinet C, Petitjean T, De Regge N, Cay B. Resurgence of Schmallerberg virus in Belgium after 3 years of epidemiological silence. *Transbound Emerg Dis.* 2017;64(5):1641-1642
- Dimitraki M, Tsikouras P, Bouchlariotou S, Dafopoulos A, Konstantou E, Liberis V. Prenatal assessment of arthrogryposis. A review of the literature. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011;24(1):32-36
- Doceul V, Lara E, Sailleau C, et al. Epidemiology, molecular virology and diagnostics of Schmallerberg virus, an emerging orthobunyavirus in Europe. *Vet Res.* 2013;14:31
- Dominguez M, Hendrikx P, Zientara S, Calavas D, Jay M, Touratier A, et al. Preliminary estimate of Schmallerberg virus infection impact in sheep flocks - France. *Vet Rec.* 2012;171(17):426
- Elbers AR, Loeffen WL, Quak S, et al. Seroprevalence of Schmallerberg virus antibodies among dairy cattle, the Netherlands, winter 2011–2012. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(7):1065–1071
- Elbers AR, Meiswinkel R, van Weezep E. Sloet van Oldruitenborgh- Oosterbaan MM, Kooi EA. Schmallerberg virus in *Culicoides* spp. biting midges, the Netherlands, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(1):106–109
- Elbers AR, Stockhofe-Zurwieden N, van der Poel WH. Schmallerberg virus antibody persistence in adult cattle after natural infection and decay of maternal antibodies in calves. *BMC Vet Res.* 2014;10:103
- Elliott RM, Blakqori G, van Knippenberg IC, et al. Establishment of a reverse genetics system for Schmallerberg virus, a newly emerged orthobunyavirus in Europe. *J Gen Virol.* 2013;94(4):851–859

- Endalew AD, Faburay B, Trujillo JD, Gaudreault NN, Davis AS, Shivanna V, Sunwoo SY, Ma W, Drolet BS, McVey DS, Morozov I, Wilson WC, Richt JA. Immunogenicity and efficacy of Schmallerberg virus envelope glycoprotein subunit vaccines. *J Vet Sci.* 2019(6):e58
- European Food Safety Authority [homepage on the Internet]. Schmallerberg virus: state of art; 2014. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/doc/3681.pdf>. Accessed January 10, 2015
- Fischer M, Hoffmann B, Goller KV, Hoper D, Wernike K, Beer M. A mutation ‘hot spot’ in the Schmallerberg virus M segment. *J Gen Virol.* 2013;94(6):1161–1167
- Fischer M, Schirrmeier H, Wernike K, Wegelt A, Beer M, Hoffmann B. Development of a pan-Simbu real-time reverse transcriptase PCR for the detection of Simbu serogroup viruses and comparison with SBV diagnostic PCR systems. *Virol J.* 2013;10:327
- Forrester, N., Coffey, L., and Weaver, S. Arboviral Bottlenecks and Challenges to Maintaining Diversity and Fitness during Mosquito Transmission. *Viruses* 2014;6, 3991–4004
- Gache K, Zientara S, Collin E, Authié E, Dion F, Garin E, Zanella G, Calavas D. Spatial and temporal patterns of Schmallerberg virus in France in 2016. *Vet. Rec.* 2018;182, 575
- Gerhauser I, Weigand M, Hahn K, et al. Lack of schmallerberg virus in ruminant brain tissues archived from 1961 to 2010 in Germany. *J Comp Pathol.* 2014;150(2–3):151–154
- Goffredo M, Monaco F, Capelli G, et al. Schmallerberg virus in Italy: a retrospective survey in *Culicoides* stored during the bluetongue Italian surveillance program. *Prev Vet Med.* 2013;111:230–236
- Goller KV, Hoper D, Schirrmeier H, Mettenleiter TC, Beer M. Schmallerberg virus as possible ancestor of Shamonda virus. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(10):1644–1646
- Gubbins S, Turner J, Baylis M, van der Stede Y, van Schaik G, Abrahantes JC, Wilson AJ. Inferences about the transmission of Schmallerberg virus within and between farms. *Prev Vet Med.* 2014;116 (4):380-390
- Haider N, Cuellar AC, Kjær LJ, Sørensen JH, Bødker R. Microclimatic temperatures at Danish cattle farms, 2000-2016: quantifying the temporal and spatial variation in the transmission potential of Schmallerberg virus. *Parasit Vectors.* 2018;11(1):128
- Harris KA, Eglin RD, Hayward S, Milnes A, Davies I, Cook AJC, et al. The impact of Schmallerberg virus on British sheep farms during the 2011/2012 lambing season. *Vet Rec.* 2014;175(7):172
- Hechinger S, Wernike K, Beer M. Evaluating the protective efficacy of a trivalent vaccine containing Akabane virus, Aino virus and Chuzan virus against Schmallerberg virus infection. *Vet Res.* 2013;44:114
- Herder V, Wohlsein P, Peters M, Hansmann F, Baumgartner W. Salient lesions in domestic ruminants infected with the emerging so-called Schmallerberg virus in Germany. *Vet Pathol.* 2012;49(4):588–591

- Hoffmann B, Scheuch M, Höper D, et al. Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(3):469–472
- Huang CC, Huang TS, Deng MC, Jong MH, Lin SY. Natural infections of pigs with akabane virus. *Vet Microbiol.* 2003;94(1):1-11
- Humphries D, Burr P. Schmallerberg virus milk antibody ELISA. *Vet Rec.* 2012;171(20):511–512
- Kameke D, Werner D, Hoffmann B, Lutz W, Kampen H. Schmallerberg virus in Germany 2011–2014: searching for the vectors. *Parasitol Res.* 2016;115(2):527–34
- Kęsik-Maliszewska J, Larska M, Collins ÁB, Rola J. Post-Epidemic Distribution of Schmallerberg Virus in Culicoides Arbovirus Vectors in Poland. *Viruses.* 2019;11(5):447. doi: 10.3390/v11050447
- Kirkland PD, Barry RD, Harper PA, Zelski RZ. The development of Akabane virus-induced congenital abnormalities in cattle. *Vet Rec.* 1988;122(24):582–586
- Kirkland PD. Akabane Virus Infection. *Rev Sci Tech.* 2015; 34(2): 403-410
- Kirschvink N, Raes M, Saegerman C. Impact of a natural bluetongue serotype 8 infection on semen quality of Belgian rams in 2007. *Vet J.* 2009;182(2):244–251
- Koenraadt CJ, Balenghien T, Carpenter S, et al. Bluetongue, Schmallerberg – what is next? *Culicoides*-borne viral diseases in the 21st century. *BMC Vet Res.* 2014;10:77
- Kono R, Hirata M, Kaji M, Goto Y, Ikeda S, Yanase T, Kato T, Tanaka S, Tsutsui T, Imada T, Yamakawa M. Bovine epizootic encephalomyelitis caused by Akabane virus in southern Japan. *BMC Vet Res.* 2008;4:20
- Kowalczyk B, Feluś J. Arthrogryposis: an update on clinical aspects, etiology, and treatment strategies. *Arch Med Sci.* 2016 Feb 1;12(1):10-24
- Kurogi H, Inaba Y, Goto Y, Miura Y, Takahashi H. Serologic evidence for etiologic role of Akabane virus in epizootic abortion-arthrogryposis- hydranencephaly in cattle in Japan, 1972–1974. *Arch Virol.* 1975;47(1): 71–83
- Lafferty KD. The ecology of climate change and infectious diseases. *Ecology.* 2009;90:888–900
- Laloy E, Bréard E, Trapp S, Pozzi N, Riou M, Barc C, Breton S, Delaunay R, Cordonnier N, Chateau-Joubert S. Fetopathic effects of experimental Schmallerberg virus infection in pregnant goats. *Vet. Microbiol.* 2017;211:141–149
- Leemans J, Hamers C, Chery R, et al. Interference of colostral antibodies with response to a Bluetongue serotype 8 inactivated vaccine in lambs born from hyperimmune ewes. *Vaccine.* 2013;31(15):1975–1980
- Lehmann K, Werner D, Hoffmann B, Kampen H. PCR identification of culicoid biting midges (*Diptera, Ceratopogonidae*) of the *Obsoletus* complex including putative vectors of bluetongue and Schmallerberg viruses. *Parasit Vectors.* 2012;5:213
- Lievaart-Peterson K, Lutikholt S, Peperkamp K, Van den Brom R, Vellema P. Schmallerberg disease in sheep or goats: Past, present and future. *Vet Micro.* 2015;181(1-2):147–153

- Linden A, Grégoire F, Nahayo A, Hanrez D, Mousset B, Massart AL, De Leeuw I, Vandemeulebroucke E, Vandebussche F, De Clercq K. Bluetongue Virus in Wild Deer, Belgium, 2005–2008. *Emerg Infect Dis.* 2010;16: 833–836
- Lutikholt S, Veldhuis A, van den Brom R, et al. Risk factors for malformations and impact on reproductive performance and mortality rates of Schmallenberg virus in sheep flocks in the Netherlands. *PLoS One.* 2014;9(6):e100135
- Martinelle L, Dal Pozzo F, Gauthier B, Kirschvink N, Saegerman C. Field veterinary survey on clinical and economic impact of Schmallenberg virus in Belgium. *Transbound Emerg Dis.* 2014;61(3):285–288
- Martinelle L, Poskin A, Dal Pozzo F, De Regge N, Cay B, Saegerman C. Experimental Infection of Sheep at 45 and 60 Days of Gestation with Schmallenberg Virus Readily Led to Placental Colonization without Causing Congenital Malformations. *PLoS One.* 2015;10(9):e0139375
- McGrath G, More SJ, O’Neill R. Hypothetical route of the introduction of Schmallenberg virus into Ireland using two complementary analyses. *Vet Rec.* 2018;182(8):226
- Mehlhorn, H., Walldorf, V., Klimpel, S., Schmahl, G., Al-Quraishy, S., Walldorf, U., Mehlhorn, B., and Bätza, H.-J. (2009). Entomological survey on vectors of Bluetongue virus in Northrhine-Westfalia (Germany) during 2007 and 2008. *Parasitol. Res.* 105, 321–329
- Mellor PS. Infection of the vectors and bluetongue epidemiology in Europe. *Vet Ital.* 2004;40:167–174
- Menzies FD, McCullough SJ, McKeown IM, et al. Evidence for transplacental and contact transmission of bluetongue virus in cattle. *Vet Rec.* 2008;163:203–209
- Méroc E, Poskin A, Van Loo H, Van Driessche E, Czaplicki G, Quinet C, Riocreux F, De Regge N, Caij B, van den Berg T, Hooyberghs J, Van der Stede Y. Follow-up of the Schmallenberg Virus Seroprevalence in Belgian Cattle. *Transbound Emerg Dis.* 2015;62(5):e80-84
- Mievis P. Flash du 13 février 2012 : bilan de la vague de froid. *MeteoBelgique* 2012. Available from: <https://www.meteobelgique.be/article/nouvelles/la-suite/1747-flash-du-13-fevrier-2012-premier-bilan-de-la-vague-de-froid>. Accessed October 10, 2022
- Molini U, Capobianco Dondona A, Hilbert R, Monaco F. Antibodies against Schmallenberg virus detected in cattle in the Otjozondjupa region, Namibia. *J S Afr Vet Assoc.* 2018;89(1):1–2
- Muller U, Kemmerling K, Straet D, Janowitz U, Sauerwein H. Effects of bluetongue virus infection on sperm quality in bulls: a preliminary report. *Vet J.* 2010;186(3):402–403
- Oymans J, van Keulen L, Wichgers Schreur PJ, Kortekaas J. Early Pathogenesis of Wesselsbron Disease in Pregnant Ewes. *Pathogens.* 2020;9(5):373. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050373>

- Pejaković S, Wiggers L, Coupeau D, Kirschvink N, Mason J, Muylkens B. Test selection for antibody detection according to the seroprevalence level of Schmallenberg virus in sheep. *PLoS One*. 2018;13(4):e0196532
- Peperkamp NH, Lutikholt SJ, Dijkman R, Vos JH, Junker K, Greijden S, Roumen MP, van Garderen E, Meertens N, van Maanen C, Lievaart K, van Wuyckhuise L, Wouda W. Ovine and Bovine Congenital Abnormalities Associated With Intrauterine Infection With Schmallenberg Virus. *Vet Pathol*. 2015;52(6):1057-1066
- Ponsart C, Pozzi N, Bréard E, et al. Evidence of excretion of Schmallenberg virus in bull semen. *Vet Res*. 2014;45:37
- Poskin A, Martinelle L, Mostin L, et al. Dose-dependent effect of experimental Schmallenberg virus infection in sheep. *Vet J*. 2014;201(3): 419–422
- Poskin A, Van Campe W, Mostin L, Cay B, De Regge N. Experimental Schmallenberg virus infection of pigs. *Vet Microbiol*. 2014;170(3–4): 398–402
- Poskin A, Théron L, Hanon JB, Saegerman C, Vervaeke M, Van der Stede Y, Cay B, De Regge N. Reconstruction of the Schmallenberg virus epidemic in Belgium: Complementary use of disease surveillance approaches. *Vet Microbiol*. 2016;183:50-61
- ProMED-mail [homepage on the Internet]. Schmallenberg virus – Europe (34): decline, update; 2012. Available from: <http://www.promedmail.org/direct.php?id=1115024>. Accessed January 14, 2015
- ProMED-mail [homepage on the Internet]. Schmallenberg virus – Europe (35): Netherlands, Germany, bovine; 2014. Available from: <http://www.promedmail.org/direct.php?id=2978286>. Accessed January 14, 2015
- Purse BV, Carpenter S, Venter GJ, Bellis G, Mullens BA. Bionomics of temperate and tropical Culicoides midges: knowledge gaps and consequences for transmission of Culicoides-borne viruses. *Annu Rev Entomol*. 2015;60:373-392
- Rasekh M, Sarani A, Hashemi SH. Detection of Schmallenberg virus antibody in equine population of Northern and Northeast of Iran. *Vet World*. 2018;11(1):30–33
- Rasmussen LD, Kristensen B, Kirkeby C, et al. Culicoids as vectors of Schmallenberg virus. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(7):1204–1206
- Reusken C, van den Wijngaard C, van Beek P, et al. Lack of evidence for zoonotic transmission of Schmallenberg virus. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(11):1746–1754
- Roberts HC, Elbers ARW, Conraths FJ, Holsteg M, Hoereth-Boentgen D, Gethmann J, van Schaik G. Response to an emerging vector-borne disease: Surveillance and preparedness for Schmallenberg virus. *Prev Vet Med*. 2014;116(4):341–349
- Roche B, Dedieu BB, Ingrand S. Taux de renouvellement et pratiques de réforme et de recrutement en élevage bovin allaitant du Limousin. *Prod. Anim*. 2001;14(4):255-263
- Rodríguez-Prieto V, Kukielka D, Mouriño M, Paradell H, Plaja L, Urniza A, Sánchez-Vizcaíno JM. Natural Immunity of Sheep and Lambs Against the Schmallenberg Virus Infection. *Transbound Emerg Dis*. 2016;63(2):e220–228
- Saeed MF, Li L, Wang H, Weaver SC, Barrett AD. Phylogeny of the Simbu serogroup of the genus Bunyavirus. *J Gen Virol*. 2001;82(9):2173–2181

- Saegerman C, Mellor P, Uyttenhoef A, et al. The most likely time and place of introduction of BTV8 into Belgian ruminants. *PLoS One*. 2010;5(2):e9405
- Saegerman C, Bolkaerts B, Baricalla C, et al. The impact of naturally- occurring, trans-placental bluetongue virus serotype-8 infection on reproductive performance in sheep. *Vet J*. 2011;187(1):72–80
- Saegerman C, Martinelle L, Dal Pozzo F, Kirschvink N. Preliminary survey on the impact of Schmallenberg virus on sheep flocks in South of Belgium. *Transbound Emerg Dis*. 2014;61(5):469–472
- Sanders CJ, Shortall CR, Gubbins S, et al. Influence of season and meteorological parameters on flight activity of *Culicoides* biting midges. *J Appl Ecol*. 2011;48(6):1355–1364
- Sanders CJ, Shortall CR, England M, Harrington R, Purse B, Burgin L, Carpenter S, Gubbins S. Long-term shifts in the seasonal abundance of adult *Culicoides* biting midges and their impact on the potential for arbovirus outbreaks. *J. Appl. Ecol*. 2019;56(7):1649-1660
- Sarvašová A, Kočišová A, Liptáková E, Hiavatá H, Mathieu B. First insights into indoor and outdoor *Culicoides* activity related to the risk period for Bluetongue virus transmission in Eastern Slovakia. *Acta Parasitol*. 2016;61(4):743-755
- Scholte EJ, Mars MH, Braks M, et al. No evidence for the persistence of Schmallenberg virus in overwintering mosquitoes. *Med Vet Entomol*. 2014;28:110–115
- Schulz C, Wernike K, Beer M, Hoffmann B. Infectious Schmallenberg virus from bovine semen, Germany. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(2):338–340
- Sedda L, Rogers DJ. The influence of the wind in the Schmallenberg virus outbreak in Europe. *Sci Rep*. 2013;3:3361
- Sohier C, Deblauwe I, Van Loo T, Hanon J-B, Cay AB, De Regge N. Evidence of extensive renewed Schmallenberg virus circulation in Belgium during summer of 2016 - increase in arthrogryposis-hydranencephaly cases expected. *Transbound Emerg Dis*. 2017(a);64 :1015–1019
- Sohier C, Michiels R, Kapps E, Van Mael E, Quinet C, Cay AB, De Regge N. Unchanged Schmallenberg virus seroprevalence in the Belgian sheep population after the vector season of 2014 and 2015 despite evidence of virus circulation. *Res. Vet. Sci*. 2017(b);114 :177–180
- Steukers L, Bertels G, Cay AB, Nauwynck H. Schmallenberg virus: emergence of an Orthobunyavirus among ruminants in Western Europe. *Vlaams Diergeneeskdt Tijdschr*. 2012;81(3):119–127
- Stokes JE, Tarlinton RE, Lovatt F, Baylis M, Carson A, Duncan JS. Survey to determine the farm-level impact of Schmallenberg virus during the 2016–2017 United Kingdom lambing season. *Vet Rec*. 2018;183(22):690
- Thamamongood T, Aebischer A, Wagner V, Chang MW, Elling R, Benner C, García-Sastre A, Kochs G, Beer M, Schwemmler M. A Genome-Wide CRISPR-Cas9 Screen Reveals the Requirement of Host Cell Sulfation for Schmallenberg Virus Infection. *J Virol*. 2020;94(17):e00752-20

- Tarlinton R, Daly J, Dunham S, Kydd J. The challenge of Schmallenberg virus emergence in Europe. *Vet J.* 2012;194(1):10–18
- Tsuda T, Yoshida K, Ohashi S, et al. Arthrogryposis, hydranencephaly and cerebellar hypoplasia syndrome in neonatal calves resulting from intrauterine infection with Aino virus. *Vet Res.* 2004;35(5): 531–538
- van der Poel WH, Cay B, Zientara S. Limited interlaboratory comparison of Schmallenberg virus antibody detection in serum samples. *Vet Rec.* 2014;174(15):380
- Varela M, Schnettler E, Caporale M, Murgia C, Barry G, McFarlane M, et al. Schmallenberg virus pathogenesis, tropism and interaction with the innate immune system of the host. *PLoS Pathogens.* 2013;9(1):e1003133
- Veldhuis AM, Santman-Berends IM, Gethmann JM, et al. Schmallenberg virus epidemic: impact on milk production, reproductive performance and mortality in dairy cattle in the Netherlands and Kleve district, Germany. *Prev Vet Med.* 2014;116(4):412–422
- Vercauteren G, Miry C, Vandebussche F, et al. Bluetongue virus sero- type 8-associated congenital hydranencephaly in calves. *Transbound Emerg Dis.* 2008;55:293–298
- Veronesi E, Henstock M, Gubbins S, et al. Implicating *Culicoides* biting midges as vectors of Schmallenberg virus using semi-quantitative RT-PCR. *PLoS One.* 2013;8(3):e57747
- Wernike K, Kohn M, Conraths FJ, Werner D, Kameke D, Hechinger S, et al. Transmission of Schmallenberg virus during winter, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(10):1701
- Wernike K, Holsteg M, Schirrmeier H, Hoffmann B, Beer M. Natural infection of pregnant cows with Schmallenberg virus – a follow-up study. *PLoS One.* 2014;9(5):e98223
- Wernike K, Jost H, Becker N, Schmidt-Chanasit J, Beer M. Lack of evidence for the presence of Schmallenberg virus in mosquitoes in Germany, 2011. *Parasit Vectors.* 2014;7:402
- Wernike K, Holsteg M, Saßerath M, Beer M. Schmallenberg virus antibody development and decline in a naturally infected dairy cattle herd in Germany, 2011–2014. *Vet Microbiol.* 2015;181(3):294–297
- Wernike K and Beer M. Schmallenberg Virus: A Novel Virus of Veterinary Importance. *Adv. Virus Res.* 2017;99, 39–60
- Wernike K, Holsteg M, Szillat KP, Beer M. Development of within-herd immunity and long-term persistence of antibodies against Schmallenberg virus in naturally infected cattle. *BMC Vet. Res.* 2018;14, 368
- Yanase T, Kato T, Aizawa M. Genetic reassortment between Sathuperi and Shamonda viruses of the genus Orthobunyavirus in nature: implications for their genetic relationship to Schmallenberg virus. *Arch Virol.* 2012;157(8):1611–1616

- Zhai S-L, Lv D-H, Wen X-H, Zhu X-L, Yang Y-Q, Chen Q-L, et al. Preliminary serological evidence for Schmallenberg virus infection in China. *Trop Anim Health Prod.* 2018;50(2):449–453

Annexes

Schmallenberg Virus among Female Lambs, Belgium, 2012

François Claine, Damien Coupeau, Laetitia Wiggers, Benoît Muylkens, and Nathalie Kirschvink

Reemergence of Schmallenberg virus (SBV) occurred among lambs ($n = 50$) in a sheep flock in Belgium between mid-July and mid-October 2012. Bimonthly assessment by quantitative reverse transcription PCR and seroneutralization demonstrated that 100% of lambs were infected. Viremia duration may be longer in naturally infected than in experimentally infected animals.

During late summer and fall 2011, a nonspecific febrile syndrome characterized by hyperthermia, decreased milk production, and diarrhea occurred among lactating cows in Germany. A new virus, named Schmallenberg virus (SBV), was identified as the cause (1). This arbovirus of the genus *Orthobunyavirus*, family *Bunyaviridae*, affects domestic and wild ruminants and has been documented in Western European countries since 2011 (2). The most notable consequences of this new pathogen are caused by its ability to cross the placental barrier. Depending on the gestational age of the offspring, abortion, stillbirth, or severe congenital malformations, including arthrogryposis and defects of central nervous system, might occur (3,4). Transplacental infection of offspring that occurred during 2011 led to economic losses in animal husbandry of sheep, goats, and cattle during birthing periods occurring during November 2011 through spring 2012 (5,6).

Several vectors of SBV have been identified. Biting midges, small flying insects of the species *Culicoides*, were vectors for serotype 8 of bluetongue virus that emerged during 2006 in Europe (7), and they seem to play a key role in spreading SBV (8,9). Similar to distribution of serotype 8 of bluetongue virus in 2007 (10), SBV circulation occurred during 2012 in regions where viral circulation was limited or not yet detected in 2011 (11). However, few investigations of acute viral circulation in regions where most of the ruminant livestock were infected during 2011 have been performed. The high in-flock seroprevalence ranging from 70–100% in regions documenting SBV outbreaks

(i.e., North Rhine-Westphalia in Germany, the Eastern part of Belgium, and the southern part of the Netherlands) is believed to limit reemergence of SBV (12).

The objective of this study was to assess whether SBV reemergence occurred in a sheep flock that had experienced an SBV infection outbreak during autumn 2011 and reached a seroconversion rate of 99.5% (13). Female lambs born in late autumn 2011 or early winter 2012 were followed bimonthly to assess natural SBV primary infection by using quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) and seroneutralization (SN).

The Study

Sheep of a flock that belonged to the University of Namur that included ≈ 400 ewes (Ile de France, Laitier Belge, French Texel, and crossbred) and ≈ 20 rams were investigated. During the lambing period of January 2012, 28 (17%) of 163 newborn lambs showed signs of congenital SBV infection that was confirmed by real-time RT-qPCR and SN assay (13). Two SBV strains were isolated in cell culture of brain tissue samples from congenitally infected lambs (14). Retrospective analysis of sentinels' serum samples collected monthly in 2011 indicated that SBV infection of the flock occurred after September 15, 2011. SN assays were performed for all animals ($n = 450$) of the flock in January 2012 and revealed a seroprevalence of 99.5% (13).

Fifty female lambs born in autumn 2011 ($n = 38$) and January 2012 ($n = 12$) that were kept for breeding purposes were investigated by analyzing bimonthly blood samples collected during April–October 2012. The investigation protocol was approved by the Ethical Committee for Animal Welfare of the University of Namur (project 12/185). The animals were kept on pasture and underwent daily visual inspection. Blood was collected bimonthly and serum samples were analyzed by real-time RT-qPCR developed at the Friedrich Loeffler Institute (1) and by SN assay. RT-qPCR was performed on total RNA extracted from serum stored at -80°C . SN was performed after overnight incubation of a series of 2-fold dilutions for each serum sample with 100–200 tissue culture infectious dose₅₀ of SBV (isolate SBV-BH80/11–4). Virus back titration was performed. The data were respectively expressed as cycle threshold (C_t) and \log_2 50% effective dose values. Results were considered positive at $C_t < 40$ and \log_2 50% effective dose > 3.5 .

As shown in Figure 1, the SBV infection of the sentinels evidenced by RT-qPCR was first detected around mid-July and ended in mid-October 2012. Before this period, RT-qPCR results were negative and decrease of colostrum derived antibodies was observed (data not shown). Few animals were infected in July (3 animals were positive by using RT-qPCR on July 27) and at the beginning of August. Of the positive RT-qPCR results, 80% were found between mid-August and late September. By October 17, ≥ 1 positive

Author affiliation: Namur Research Institute for Life Sciences, University of Namur, Namur, Belgium

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1907.121768>

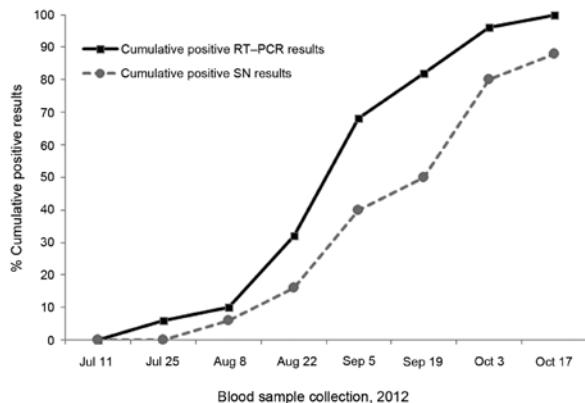


Figure 1. Time course of Schmallenberg virus spread among 50 infection-naive female lambs assessed bimonthly by real-time quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) and seroneutralization (SN). Cumulative positive results (cycle threshold <40 and \log_2 50% effective dose >3.5) obtained during July–October 2012 are expressed as percentages.

RT-qPCR result had been detected for each animal (median C_t 37.03; minimum 29.4, maximum 39.5). SN assay revealed positive results for SBV antibody titers within 2–4 weeks after infection evidenced by RT-qPCR results. These findings are similar to observations made after experimental and natural SBV infection in cattle (1,10). During the period of monitoring, no clinical signs were detected.

Against all expectations, all animals were positive for SBV at least once by using RT-qPCR. Ten lambs (20% of the investigated population) tested positive at 2-week intervals (Figure 2). This unexpected finding indicates that the duration of viremia in sheep (assessed as positive RT-qPCR result) may be longer after natural SBV infection in comparison to experimental SBV infection in cattle (1).

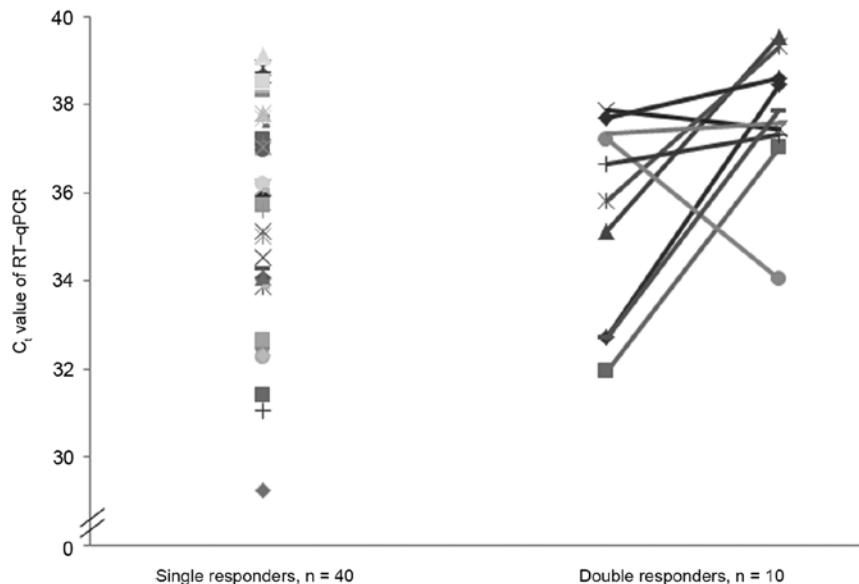


Figure 2. Individual cycle threshold (C_t) values of real-time quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) in 50 female lambs at time of natural infection by Schmallenberg virus. C_t values of lambs that tested positive once (single responders, $n = 40$) and those of lambs that tested positive twice during a 2-week interval (double responders, $n = 10$) are shown. Each symbol represents 1 lamb.

Although further investigations of a larger number of animals are needed, these preliminary results suggest that the time course of SBV infection depends on the age of the lambs (Table). The onset of SBV infection among lambs born in January 2012 occurred with a delay of 1 month. This finding is likely to be caused by the decrease of colostrum protection.

The data collected during this study demonstrate that, even in regions with a high SBV seroprevalence, viral circulation and primary infection of naive animals occur. In addition to the question of duration of colostrum protection, this observation raises questions about virus hosts. It might be hypothesized that other species are reservoirs. In autumn 2011, a seroprevalence of $\approx 43\%$ was found in deer in the province of Namur (15), suggesting that deer might have been a reservoir during 2011–2012. Serum samples of 3 roe deer hunted in autumn 2012 in the forest near the sheep flock observed in this study tested positive by SN assay (N. Kirschvink, pers. comm.), indicating a higher percentage of seroconversion among samples from deer in 2012. It might further be speculated that notable vector activity favored viral circulation. During the summer 2007 serotype 8 of bluetongue virus outbreak, vector activity was assessed among the study flock of sheep and revealed substantial numbers of newly emerged female *Culicoides* spp. midges (7). This peak activity of vectors paralleled the episode of clinical serotype 8 of bluetongue virus manifestation. Hypothesizing that the local *Culicoides* spp. midge population did not substantially change over years, the intense infection rate during August–September 2012 could be related to increased seasonal vector activity.

Although reemergence of SBV among cattle is of concern, reemergence of SBV among sheep and goats is of particular importance, because high prolificacy and

Table: Time course of Schmallenberg virus spreading among female lambs born in late autumn and in January 2013 assessed by RT-qPCR and seroneutralization *

Date of blood sampling	2012							
	Jul 11	Jul 25	Aug 8	Aug 22	Sep 5	Sep 17	Oct 3	Oct 17
	No. (%) cumulative positive RT-qPCR results at each sampling date							
Lambs born in autumn 2012†	0	3 (8)	5 (13)	11 (29)	25 (66)	30 (79)	36 (95)	38 (100)
Lambs born in January 2013‡	0	0	0	5 (42)	9 (75)	11 (92)	12 (100)	12 (100)
	No. (%) cumulated positive seroneutralization results at each sampling date							
Lambs born in autumn 2012†	0	0	3 (8)	8 (21)	18 (47)	22 (58)	33 (87)	35 (92)
Lambs born in January 2013‡	0	0	0	0	2 (17)	2 (17)	6 (50)	8(67)

*Cumulated positive results obtained between July and October 2012 are expressed as absolute numbers and percentages. RT-qPCR results were considered positive if cycle threshold value was <40. Seroneutralization results were considered positive if log₂ 50% effective dose values were > 3.5. RT-qPCR, real-time reverse transcription quantitative PCR.
†n=38.
‡n=12.

intensive reproduction of sheep and goats continuously lead to a noteworthy percentage of susceptible animals among the population. Moreover, the early onset of puberty in these species increases the probability of SBV infection at an early stage of gestation, leading to potential virus overwintering by transplacental infection of offspring, which could potentially lead to economic loss related to death or culling of offspring. Detailed knowledge about duration of viremia after natural SBV infection and duration of colostral protection are necessary for elaboration of efficient breeding and vaccination strategies.

Acknowledgments

We thank Benoît Bolkaerts, Christine Baricalla, Marianne Raes, and Nicolas Noël for their valuable technical assistance during sample collection. We thank Dr Martin Beer (FLI, Insel Riems) for having provided us the SBV RT-qPCR protocol and original virus isolate (SBV-BH80/11-4).

Mr Claine is a veterinary PhD student in the Veterinary Integrated Research Unit at University of Namur and investigates the impact of Schmallenberg virus infection on the unit's research sheep flock.

References

- Hoffmann B, Scheuch M, Hoper D, Jungblut R, Holsteg M, Schirmeier H, et al. Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:469–72. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1803.111905>
- Beer M, Conraths FJ, Van der Poel WH. 'Schmallenberg virus'—a novel orthobunyavirus emerging in Europe. *Epidemiol Infect.* 2013;141:1–8. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268812002245>
- van den Brom R, Lutikholt SJ, Lievaart-Peterson K, Peperkamp NH, Mars MH, van der Poel WH, et al. Epizootic of ovine congenital malformations associated with Schmallenberg virus infection. *Tijdschr Diergeneesk.* 2012;137:106–11.
- Martinelle L, Dal Pozzo F, Kirschvink N, de la Grandière MA, Thiry E, Saegerman C. Schmallenberg virus or the emergence of the first orthobunyavirus of the serogroup Simbu in Europe. *Ann Méd Vét.* 2012;156:7–24 [cited 2012 Mar 10]. <http://www.facmv.ulg.ac.be/amv/resume.php?type=en&id=317>
- Martinelle L, Dal Pozzo F, Gauthier B, Kirschvink N, Saegerman C. Field veterinary survey on clinical and economic impact of Schmallenberg virus in Belgium. *Transbound Emerg Dis.* Epub 2012 Dec 24.
- Saegerman C, Martinelle L, Dal Pozzo F, Kirschvink N. Preliminary survey on the impact of Schmallenberg virus on sheep flocks in South of Belgium. *Transbound Emerg Dis.* Epub 2013 Jan 7.
- Zimmer JY, Haubruge E, Francis F, Bortels J, Joie E, Simonon G, et al. Distribution of potential bluetongue vectors on Belgium farms. *Vet Rec.* 2008;162:700. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.162.21.700>
- De Regge N, Deblauwe I, De Deken R, Vantiegheem P, Madder M, Geysen D, et al. Detection of Schmallenberg virus in different *Culicoides* spp. by real-time RT-PCR. *Transbound Emerg Dis.* 2012;59:471–5. <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12000>
- Rasmussen LD, Kristensen B, Kirkeby C, Rasmussen TB, Belsham GJ, Bodker R, et al. Culicoids as vectors of Schmallenberg virus. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:1204–6. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1807.120385>
- Saegerman C, Bolkaerts B, Baricalla C, Raes M, Wiggers L, de Leeuw I, et al. The impact of naturally-occurring, trans-placental bluetongue virus serotype-8 infection on reproductive performance in sheep. *Vet J.* 2011;187:72–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.11.012>
- Sailleau C, Bréard E, Viarouge C, Desprat A, Doceul V, Lara E, et al. Acute Schmallenberg virus infections, France, 2012. *Emerg Infect Dis.* 2013;19:321–2. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1902.121281>
- Elbers AR, Loeffen WL, Quak S, de Boer-Luijtz E, van der Spek AN, Bouwstra R, et al. Seroprevalence of Schmallenberg virus antibodies among dairy cattle, the Netherlands, winter 2011–2012. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:1065–71. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1807.120323>
- Kirschvink N, Claine F, Wiggers L, Muylkens B. Natural infection of a sheep flock with Schmallenberg virus: clinical, serological and virological features. In: *Proceedings of Epizone 2012, Schmallenberg Virus Symposium* [cited 2013 Jan 10]. http://www.epizone-eu.net/media/23368/6th%20EPIZONE%20Schmallenberg%20Virus%20Abstracts%20Booklet_July%202012b%20.pdf
- Coupeau D, Claine F, Wiggers L, Kirschvink N, Muylkens B. In vivo and in vitro identification of a hypervariable region in Schmallenberg virus. *J Gen Virol.* 2013. Epub 2013 Jan 30 [cited 2013 Mar 30]. <http://vir.sgmjournals.org/content/early/2013/01/29/vir.0.051821-0.short>
- Linden A, Desmecht D, Volpe R, Wirtgen M, Gregoire F, Pirson J, et al. Epizootic spread of Schmallenberg virus among wild cervids, Belgium, Fall 2011. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:2006–8. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1812.121067>

Address for correspondence: Nathalie Kirschvink, Veterinary Integrated Research Unit, Faculty of Sciences, Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS), University of Namur (UNamur), 5000 Namur, Belgium; email: nathalie.kirschvink@unamur.be

1 REVIEW

2 Schmallerberg virus infection of ruminants

3 Claine et al

4 Schmallerberg virus infection of ruminants: challenges and opportunities for
5 veterinarians

6 François Claine

7 Damien Coupeau

8 Laetitia Wiggers

9 Benoît Muylkens

10 Nathalie Kirschvink

11 Veterinary Department, Faculty of Sciences, Namur Research Institute for
12 Life Sciences (NARILIS), University of Namur (UNamur), Namur, Belgium

13 Correspondence: Nathalie Kirschvink

14 Veterinary Department, Faculty of Sciences, Namur Research Institute for
15 Life Sciences (NARILIS), University of Namur (UNamur), 61 rue de
16 Bruxelles, 5000 Namur, Belgium

17 Tel +32 81 72 4379

18 Email nathalie.kirschvink@unamur.be

19 **Abstract:** In 2011, European ruminant flocks were infected by
20 Schmallerberg virus (SBV) leading to transient disease in adult cattle but
21 abortions and congenital deformities in calves, lambs, and goat kids. SBV
22 belonging to the Simbu serogroup (family *Bunyaviridae* and genus
23 *Orthobunyavirus*) was first discovered in the same region where bluetongue
24 virus serotype 8 (BTV-8) emerged 5 years before. Both viruses are
25 transmitted by biting midges (*Culicoides* spp.) and share several similarities.
26 This paper describes the current knowledge of temporal and geographical
27 spread, molecular virology, transmission and susceptible species, clinical

28 signs, diagnosis, prevention and control, impact on ruminant health, and
29 productivity of SBV infection in Europe, and compares SBV infection with
30 BTV-8 infection in ruminants.

31 **Keywords:** Schmallenberg virus, Europe, ruminants, review

32 **Introduction**

33 In 2006, bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) emerged in northern Europe
34 causing economic losses to cattle and sheep farms.¹ Five years later, a novel
35 virus named Schmallenberg virus (SBV), in reference to the German city
36 where the virus was first discovered, appeared in the same geographic region,
37 but it remains uncertain whether these two viruses followed the same route of
38 introduction.² SBV from the family *Bunyaviridae* and the genus
39 *Orthobunyavirus* affects domestic ruminants (mainly cattle and sheep) as well
40 as wild ruminants (eg, buffalo, bison, red deer).³ A transient disease
41 characterized by diarrhea, hyperthermia, and drop in milk production is
42 described in adult animals, while important congenital musculoskeletal
43 deformities such as arthrogryposis are observed in neonates if infection occurs
44 during early pregnancy. SBV is transmitted by an insect vector: biting midges
45 (*Culicoides* spp.) were identified as SBV vectors. However, transplacental
46 and potential venereal transmissions were also described.⁴

47 In November 2011, the Friedrich-Loëffler Institute (FLI) in Germany
48 was the first to detect RNA of SBV in blood samples collected among
49 affected dairy cattle by metagenomic approach.⁵ Comparative genetic analysis
50 indicated that this new virus was very similar to certain members of the
51 *Orthobunyavirus* genus (eg, Akabane and Aino viruses). Even though the first
52 SBV identification was realized in late autumn 2011, SBV emerged earlier in
53 Europe: heads of *Culicoides* spp. caught in summer 2011 in Belgium were
54 real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) positive,⁶ and it was
55 demonstrated that SBV has circulated in at least three Italian provinces since

56 early September 2011.⁷ From 2011 to date, SBV geographic distribution has
57 steadily increased and now includes nearly all European countries.

58 This paper reviews current knowledge of temporal and geographical
59 spread, molecular virology, transmission and susceptible species, clinical
60 signs, diagnosis, prevention and control, impact on ruminant health, and
61 productivity of SBV infection in Europe.

62 **Temporal and geographical spread of SBV in Europe**

63 In summer 2011, first reports of unidentified disease of dairy cattle were
64 obtained from farms located in the Netherlands and Germany.⁵ In all the
65 affected farms, the major clinical sign was diarrhea associated with drop in
66 milk production and hyperthermia. In November 2011, FLI demonstrated that
67 a novel pathogen was responsible for these clinical features: SBV in reference
68 to the German city where the samples tested were collected. Shortly after, an
69 epizootic outbreak of congenital malformations, featuring an arthrogryposis
70 hydranencephaly syndrome, in newborn lambs, kids, and calves associated
71 with SBV started in northwestern Europe.⁸ At the end of 2011, Belgium, as
72 the Netherlands, reported cases of stillborn lambs or newborn lambs rapidly
73 dying with arthrogryposis and brain abnormalities.⁹ The affected farms were
74 mainly located in the north of Belgium close to the Dutch border. In early
75 spring 2012, the total number of affected herds equaled 3,628 in eight
76 countries (bovine 1,115, ovine 2,440, caprine 73).¹⁰

77 The high SBV within-flock seroprevalence (up to 98.03%) in
78 geographic areas having reported SBV outbreaks in late 2011 and 2012 was
79 expected to limit reemergence of the virus in 2012.¹¹ However, a novel SBV
80 episode occurred during summer 2012 in previously affected regions. A study
81 conducted in a Belgian sheep farm demonstrated SBV reemergence in a
82 sentinel flock of 50 ewe lambs bimonthly followed by serum neutralization
83 test and RT-PCR between mid-July and mid-October.¹² In Germany, new

84 cases of SBV infection were observed in cattle, sheep, and goats from June
85 2012 proving the ability of the virus to recirculate after winter.¹³ In 2012 and
86 2013, SBV has spread across eastern Europe. In late September 2013, a total
87 of 27 European countries were considered as SBV-infected.¹⁴

88 Figure 1 represents European countries having reported cases of SBV
89 infection in cattle, sheep, or goat herds or having detected antibodies in serum
90 or milk from summer 2011 until late 2014 presented as a cumulative list
91 (Figure 1A) and colored on a map (Figure 1B).

92 A third SBV episode was evidenced in late 2014 in the Netherlands and
93 Germany: SBV was detected in calves and lambs. In the Netherlands,
94 increased antibody levels were observed in heifers.¹⁴ As three SBV episodes
95 occurred in Europe since 2011, the case numbers of SBV-infected herds
96 largely decreased from 2012 to 2013 and 2014. However, due to flock
97 renewal and increased number of seronegative animals, malformations in
98 newborn calves and lambs might be expected in the following months if
99 heifers or ewes were infected during gestation.

100 The first outbreaks of both BTV-8 and SBV occurred in late summer.
101 But SBV spread much more rapidly in 2011 than bluetongue in 2006 affecting
102 more rapidly larger areas.¹⁵ Even though both viruses emerged in the same
103 region, the question about their route of introduction remains. The cumulative
104 proportion of infected farms over time from the start of each outbreak is
105 similar, although BTV-8 case numbers were initially higher possibly due to
106 the fact that BTV-8 was a notifiable disease.¹⁵ This was not the case for acute
107 SBV infections. The highest point of interest is certainly that SBV spread
108 more quickly than BTV-8 resulting in more difficulties to predict its extent
109 and impact. Moreover, it was more difficult to give an accurate evaluation of
110 the epidemiological situation after SBV infection in contrast to what could
111 have been done after BTV infection. Indeed, except the observations of

112 malformed calves and lambs, no clinical sign was detected in animals.

113 **Molecular virology**

114 First identification of SBV was performed by FLI in November 2011 from
115 blood samples collected among cattle presenting clinical signs such as
116 diarrhea associated with drop in milk production and hyperthermia.

117 Metagenomic analysis and comparison of sequences indicated that the closest
118 relatives were viruses from the Simbu serogroup (family *Bunyaviridae* and
119 genus *Orthobunyavirus*).⁵ Viruses from the Simbu serogroup mainly affect
120 ruminants, but none of these had been detected in Europe before. It is
121 suggested by some authors that SBV could be a reassortant between Sathuperi
122 and Shamonda viruses,¹⁶ while others think that SBV could be an ancestor of
123 Shamonda virus.¹⁷

124 *Structure and genome*

125 SBV particles are enveloped and have a diameter of approximately 100 nm.
126 SBV is a negative-sense single-stranded RNA virus whose genome is
127 composed of three segments: a large (L), a medium (M), and a small (S) one.
128 The L segment encodes the RNA-dependent RNA polymerase. The M
129 segment encodes a precursor polyprotein co-translationally cleaved into the
130 envelop proteins Gn and Gc and the nonstructural protein NSm. The S
131 segment encodes the nucleoprotein N and the nonstructural protein NSs in an
132 overlapping open-reading frame. A Belgian study conducted in 2013 showed
133 that the SBV Gc protein contained an N-terminal domain that accumulates
134 mutations in the natural course of SBV spread within flocks.¹⁸ This result
135 suggests that the variability identified in this domain may support different
136 biological processes. Among these processes, an immune evasion mechanism
137 may occur in the actual context of infection and/or adaptation of the cell
138 tropism by supporting a diversification of receptors usage and during in vitro
139 cell culture adaptation in the absence of immune selective pressure.^{18,19} The

140 impact of genetic variation is thus of first interest. Moreover, the introduction
141 of another Simbu group virus in the future in Europe may give opportunity of
142 reassortment with novel vector and virulence properties. Consequently,
143 enhanced surveillance should be recommended.²⁰

144 *Viremia*

145 In case of SBV infection, clinical signs in adult animals are observed during a
146 very short period related to a short viremic period for the virus. These
147 observations were confirmed after the first experimental infections in calves:
148 the inoculated animals became infected and remained PCR positive from
149 2 days to 5 days postinfection.⁵ After experimental infection in sheep, it was
150 shown that the duration and the level of viremia seemed to be dose
151 independent.²¹ However, a different pattern was observed in case of natural
152 SBV infection: the duration of viremia in sheep appears to be longer under
153 field conditions. Indeed, 20% of a group of sentinel ewe lambs naturally
154 infected by SBV were found PCR positive 2 weeks apart.¹² Interestingly, it
155 appears that the highest SBV genome loads for tissue samples were found in
156 mesenteric lymph nodes in most animals.²²

157 **Virus transmission and susceptible species**

158 *Vector transmission*

159 Most of the bunyaviruses present in Asia or Africa are transmitted by an
160 insect vector (biting midges or mosquitoes).²³ When SBV emerged in 2011 in
161 Europe, biting midges of the *Obsoletus* species complex of the ceratopogonid
162 genus *Culicoides* were rapidly identified as SBV vectors. Indeed, viral
163 genome was detected in different *Culicoides* spp. (*Culicoides dewulfi*,
164 *Culicoides chiopterus*, *Culicoides punctatus*, etc) caught as early as summer
165 and autumn 2011 in Belgium,⁶ Italy,⁷ the Netherlands,²⁴ and Denmark.²³
166 Under laboratory conditions, SBV replication and dissemination were
167 detected in *Culicoides sonorensis*.^{25,26}

168 About 120 different species of *Culicoides* are described in Europe. The
169 Obsoletus complex is the most abundant in European farms.²⁷ *Culicoides*
170 biting midges are implicated in transmission of several viruses of the Simbu
171 serogroup. They were recognized as major vectors of BTV-8 in northern and
172 central Europe during the 2006 outbreak of bluetongue disease.²⁸ However,
173 the vector competence for SBV may exceed rates recorded for BTV either in
174 the number of species capable of transmitting the virus or in the proportion of
175 individuals within a species.²⁰ So, it is of first interest to better understand the
176 ecology and the behavior of *Culicoides* spp. because these are elements to
177 predict epidemiology of the pathogens they transmit.²⁹ Many *Culicoides* life
178 cycles are dependent on meteorological conditions. Appetitive flight is
179 conditioned by temperature, humidity, light intensity, and wind speed.³⁰
180 Moreover, the capability of *Culicoides* spp. to overwinter and serve as
181 reservoir for new infections during the next year is of relevance to the
182 transmission of BTV and SBV.² Even though there is no evidence that other
183 insect species (eg, mosquitoes) are implied in disease spreading,³¹ mechanic
184 transmission by hematophagous insects could occur as for other viruses of the
185 Simbu group.³²

186 *Transplacental and venereal transmission*

187 If vector transmission is largely described for SBV in adult animals, fetuses
188 can be infected transplacentally leading to observations of congenital
189 deformities if viral infection occurs during the critical period of gestation.
190 However, no evidence of horizontal (animal to animal) transmission has been
191 detected.¹⁵ Besides vector-borne transmission being the most common route
192 of SBV infection, researchers have recently demonstrated that SBV RNA-
193 positive bovine semen could contain infectious SBV.^{4,33} If the risk of venereal
194 transmission exists, the insemination of dams with SBV-containing semen
195 would lead at worst to viremia of the dam facilitating vector transmission. No

196 evidence of infection of the developing embryo has been reported so far.⁴
197 Many questions remain regarding the pathogenesis of SBV infection in
198 pregnant animals, their transmission by embryo and/or gametes, and the
199 dynamics of the virus toward and in the fetus.³⁴

200 *Susceptible species*

201 Numerous species have been recognized as susceptible species to SBV
202 infection. Table 1 summarizes the animal species in which direct and/or
203 indirect SBV detection was performed and clinical expression in adults and/or
204 their offspring was observed. It appears that clinical features of SBV infection
205 have only been observed in domestic ruminants (cattle, sheep, and goats). The
206 indirect detection of the pathogen (serological reaction to SBV) has only been
207 performed in wild ruminants (eg, alpaca, buffalo, bison), zoo (eg, kudu, zebra,
208 oryx), and some other mammalian species (eg, horse, wild boar), while in
209 dogs, virological and serological evidences of SBV infection have been
210 detected. Experimental SBV infection was performed in poultry, but the
211 results indicate that the virus did not replicate.²⁰ Due to their suggestive role
212 in the epidemiology of Akabane virus, the role of pigs in the epidemiology of
213 SBV was evaluated. Experimentally SBV-infected piglets showed only
214 seroconversion underlining the inability of the virus to replicate.³⁵

215 **Clinical signs**

216 SBV infection in adult ruminants is frequently associated with no specific
217 clinical sign. It corresponds to a mild and transient disease, including reduced
218 milk production (up to 50%), inappetence, hyperthermia, and diarrhea in
219 cows.¹⁵ In sheep and goat, SBV infection remains subclinical. Only a small
220 number of herds had reported acute cases in adults (6% for cattle, 1% for
221 goats, and 3% for sheep).³⁶ This nonspecific febrile syndrome was reported
222 during summer and fall 2011 in adult dairy cows from farms in the
223 Netherlands and Germany.³⁷

224 In December 2011, the Netherlands reported the teratogenic effect of
225 SBV infection in sheep with clinical manifestations comparable to those
226 observed for Akabane and Aino viruses.^{38,39} Various congenital disorders
227 were detected in aborted fetuses or stillborn ruminants (ovine, caprine, and
228 bovine). Musculoskeletal deformities were commonly observed on the hind-
229 and forelimbs, the vertebral column, and the neck. They consisted essentially
230 of arthrogryposis, lordosis, scoliosis, torticollis, and brachygnathia inferior.⁴⁰
231 Even if these atypical lesions could be associated with other factor, sacral
232 spina bifida and cleft palate were observed in 2013 in two SBV-positive
233 stillborn lambs.⁴¹ In case of twin gestation, one twin may present previously
234 described malformations, while the other only showed neurological disorders
235 or did not present any clinical sign.⁴²

236 Macroscopically, common malformations of the central nervous system
237 (CNS) in young ruminants observed during necropsy were hydranencephaly,
238 porencephaly, lissencephaly, hydrocephalus, cerebellar and cerebral
239 hypoplasia, and micromyelia. Histological lesions included lymphohistiocytic
240 meningoencephalomyelitis in some cases, glial nodules mainly in the
241 mesencephalon and hippocampus of lambs and goats, and neuronal
242 degeneration and necrosis mainly in the brain stem of calves. Myofibrillar
243 hypoplasia could be diagnosed in lambs and calves.⁴⁰ It was suggested that
244 lesions observed on the spinal cord were responsible for fetal immobility
245 promoting arthrogryposis.³⁷

246 The presence of musculoskeletal lesions due to malformations of the
247 CNS in SBV-infected aborted fetuses or neonates led to the expression “AG-
248 HE syndrome” for arthrogryposis and hydranencephaly which is often used to
249 describe the SBV-induced deformities. Figure 2 presents the typical clinical
250 lesions of stillborn lambs affected by SBV. Intrauterine BTV infection may

251 lead to similar lesions (Figure 3).

252 The time of infection relative to the stage of gestation, and so the stage
253 of fetal development (CNS tissues, immune system), seems to determine the
254 severity of fetal malformations.⁴³ Due to numerous similarities between
255 clinical features of SBV and Akabane virus infections in neonates, it is
256 estimated that high-risk period of gestation in ruminants could be very
257 comparable. For Akabane virus, it is estimated between the 28th and 36th day
258 of gestation in sheep, the 30th and 50th day in goats, and the 76th and 174th
259 day in cattle.⁴⁴ A recent study tried to define more precisely the critical phase
260 for cattle in case of natural SBV infection of pregnant cows. Malformed
261 calves were born after SBV transplacental infection between days 60 and 144
262 of gestation, which corresponds to the critical timeframe described for viruses
263 closely related to SBV.⁴⁵

264 SBV infection of wild ruminants or other mammal species (eg, dogs)
265 was not related to clinical manifestations or malformations. To date, no
266 evidence of viral infection in humans has been reported.⁴⁶

267 **Diagnosis**

268 The diagnosis of SBV infection in living adult animals is difficult for
269 veterinarians. As previously mentioned, SBV infection is mostly subclinical
270 in adult ruminants or characterized, especially in cattle, by a febrile syndrome.
271 These clinical signs observed could be noticed in case of other viral infections
272 (eg, bovine-herpes virus type 1, bluetongue virus, foot-and-mouth disease
273 virus).⁵ However, in case of transplacental infection, congenital CNS and
274 musculoskeletal malformations such as AG-HE syndrome, aplasia or
275 hypoplasia of the cerebrum or cerebellum, and hydranencephaly presented by
276 aborted fetuses, stillborn, or newborn ruminants are more relevant. However,
277 due to similarities between clinical features of SBV and other ruminant-

278 specific viruses, only laboratory virological and/or serological diagnosis may
279 confirm hypothesis of SBV episode.

280 The direct diagnosis of SBV infection can be realized by performing
281 real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) developed by
282 FLI in 2011 on L segment of the SBV genome. A protocol targeting the S
283 segment was later developed and showed higher sensitivity.⁴⁷ Various organs
284 were tested by RT-PCR, but only some of them are suitable for SBV
285 detection.^{48,49} It was established that cerebrum, spinal cord, external placental
286 fluid, and umbilical cord are the most appropriate organs to detect SBV in
287 malformed lambs or calves.⁴⁹ Low Cq values were also obtained in adrenals
288 and gonads, meaning that higher initial copy numbers of the targeted viral
289 sequence were present in these organs (Coupeau, personal communication).
290 The brain stem also seemed to be a suitable organ to perform direct diagnosis
291 of SBV infection.⁹

292 Besides RT-qPCR, the detection of anti-SBV antibodies present in
293 serum of infected animals can be performed by indirect method of SBV
294 infection diagnosis. Virus neutralization test (VNT) and enzyme-linked
295 immunosorbent assay (ELISA) have been developed as tools for serological
296 diagnosis. If the first method appears to be time-consuming, ELISA is more
297 rapid, less expensive, and allows testing a larger number of samples,⁴² but the
298 possibility of cross-reactions with other Orthobunyaviruses from the Simbu
299 serogroup exists.⁵⁰ Moreover, ELISA tests are also able to detect anti-SBV
300 antibodies in milk.⁵¹ However, many discrepancies were observed between
301 results obtained by performing VNT and those obtained by ELISA tests. It
302 seemed that ELISA tests presented lower specificity and sensitivity.⁵²

303 Figure 4 summarizes the most commonly used diagnostic methods of
304 SBV infection in ruminants (clinical signs observed in adult animals and in
305 aborted fetuses, stillborns, or newborns, direct virological diagnosis by RT-

306 PCR, and indirect serological diagnosis by VNT or ELISA), advantages and
307 disadvantages of each of them, as well as the required material.

308 Besides the diagnostic methods mentioned above, it is necessary to
309 specify that SBV infection diagnosis can also be performed by
310 immunofluorescence and virus isolation,⁵³ but these two methods are not
311 routinely used for diagnosis. The detection of SBV proteins and RNA in
312 paraffin sections can be performed by immunochemistry and in situ
313 hybridization.⁵⁴

314 In vitro, baby hamster kidney (BHK-21) cells are the most convenient
315 hosts for SBV. The SBV genome segments were cloned as cDNA, and a
316 three-plasmid rescue system was established to recover infectious virus.⁵⁵

317 **Prevention and control**

318 Monitoring the evolution of vector population and having surveillance of the
319 virus frequency in the vector seem to be the most appropriate ways to predict
320 future viral episodes. Besides, the control of insect populations and the
321 vaccination of cattle and sheep flocks are described as the two other
322 prophylactic measures.

323 In both livestock- and human-associated species, wide-scale control of
324 larvae or adults of *Culicoides* spp. through treatment, removal, or covering of
325 development or resting sites is considered unfeasible due to the broad range
326 and abundance of habitats utilized.⁵⁶ Moreover, to control biting midges by
327 the use of insecticides is certainly a poor tool to prevent and/or control SBV
328 spread within flocks because no products are specifically licensed against
329 *Culicoides* spp.

330 Vaccination is a preventive measure able to reduce the impact of SBV
331 infection.⁵³ Vaccination costs on one hand and reduced impact of SBV
332 infection on herds and flocks on the other hand raise questions about the real
333 utility of vaccination. Moreover, due to the fact that SBV has rapidly spread

334 among almost all European countries since its emergence in 2011 and that
335 evidences of second SBV episode have not been detected in all these
336 countries, the surveillance of the virus appears to be more important than to
337 vaccinate. However, the detection of novel SBV episode in Germany and in
338 the Netherlands in late 2014 may reverse this situation because SBV could
339 circulate in flocks composed of an important number of seronegative animals.
340 Two vaccines have been developed against SBV: Bovilis SBV (MSD Animal
341 Health) and SBVvax (Merial). Recently, mutant viruses were tested as
342 modified live vaccines in cattle.⁵⁷ Vaccination usually focuses on breeding
343 animals that receive vaccination before service in order to prevent fetal
344 infection. However, there is a lack of information about long-term immunity
345 against SBV in domestic ruminants as well as duration of colostral immunity
346 in neonates. This last question is of primary interest because passive
347 immunity received by ingestion and absorption of colostrum could interfere
348 with vaccine efficacy if vaccine is administered in young ruminant under
349 colostral protection. Recent studies focus on these points in cattle and sheep.
350 It appears that in cattle, long-term immunity persists at least 2 years after
351 natural SBV infection. Based on the decay of maternal antibodies, calves
352 could efficiently be vaccinated against SBV at an age of 6 months.⁵⁸ In sheep,
353 neutralizing antibodies against SBV were detected 2 years after the first viral
354 infection, and the lambs seem to lose maternal antibodies at an age of
355 4 months.⁵⁹

356 **Impact on ruminant health and productivity**

357 SBV outbreak in Europe is considered as sanitary event of veterinary public
358 health interest,⁶⁰ but its impact remains low or limited.⁴² However, it seems to
359 be difficult to estimate real impact of SBV episode on European livestock due
360 to number of undeclared SBV-affected flocks.^{60,61} The highest proportion of
361 SBV-confirmed herds in comparison with the total number of herds per

362 region is 6.6% for sheep and 4% for cattle.⁴²

363 At a farm level, the impact of SBV infection was highly variable and is
364 likely to depend on the calving and lambing program used.²⁰ In sheep flocks,
365 especially in those where matings are spread over several periods, the
366 percentages of SBV-affected stillborns or newborns and the clinical features
367 of SBV infection observed were extremely variable. These observations could
368 be related to the fact that ewes underwent SBV infection when they were at
369 different stages of production. Mating patterns during an at-risk period
370 coinciding with a period of high vector activity are more likely to experience
371 higher impact.²⁰ In a Belgian sheep farm where SBV emerged and spread
372 between mid-September and mid-October 2011, ewes lambing in January
373 2012 gave birth to 17% (28/163) of stillborn or newborn lambs presenting
374 typical deformities, while ewes lambing in March 2012 gave birth to only 5%
375 (8/150) of aborted fetuses, and in May 2012, no impact on lambings was
376 observed.⁶² Data obtained in France on a larger scale during the first SBV
377 episode are more or less equivalent. In the Netherlands, a case–control study
378 was designed to describe the effect of SBV infection on reproductive
379 performance and on mortality rates in sheep. It appears that the impact of viral
380 episode was limited.⁸

381 In dairy cattle, a recent study tried to evaluate the impact of 2011 SBV
382 epidemic on milk production, reproductive performance, and mortality in the
383 Netherlands and Kleve district in Germany. No impact was evidenced on milk
384 production and on mortality rates in calves, and only a small decrease in
385 fertility rate was observed indicating the limited impact of SBV on
386 productivity of dairy cattle.⁶³ Even though it seems very clear that impact of
387 SBV on ruminant health and productivity was low at a herd scale, the
388 situation may be different while considering the overall meat and milk
389 industry. Indeed, restrictions made by governments concerning imports of

390 animal products from countries declared SBV affected could have a
391 significant economic impact.

392 **Comparison between BTV and SBV**

393 Similarities and differences between BTV-8 and SBV both affecting
394 ruminants and sharing numerous similarities are summarized in Table 2. Even
395 though BTV-8 and SBV strictly belong to different virus classification, both
396 are RNA viruses mainly affecting ruminant species. SBV appeared 5 years
397 after BTV-8 in northern Europe (Germany, the Netherlands, and Belgium)⁶⁴
398 but spread more rapidly to numerous European countries, while BTV-8
399 geographical spread was more limited. Several hypotheses could explain the
400 differences between BTV-8 and SBV spread. At the time of BTV-8 outbreak,
401 due to clinical evidences of viral infection in animals, restrictions on animal
402 movements were established in Europe. This was not the case for SBV
403 certainly due to the fact that SBV infection in adult ruminants was frequently
404 subclinical. Moreover, the average distances between infectious farms and
405 infected farms were shorter for BTV than for SBV suggesting differences in
406 ability of the vector to spread the disease.¹⁵ At herd- or flock level, SBV
407 spreads more rapidly than BTV-8, as suggested by higher herd- or flock
408 seroprevalence.¹¹ As duration of viremia within the ruminant host equaled 1–
409 2 weeks for both viruses, it is possible that viral replication in the vector
410 differs between BTV-8 and SBV.^{5,65}

411 These two viruses are transmitted by biting midges (*Culicoides* spp.),
412 and transplacental and venereal ways of transmission are described for both of
413 them.⁶⁵ Transmission by placentophagia is only reported for BTV-8.⁶⁶ If
414 clinical signs induced by SBV infection consisted in mild and transient
415 disease essentially detected in cattle and sheep, BTV-8 infection in sheep led
416 to numerous and intense clinical signs. Congestion of the head associated with
417 excessive salivation and ulceration of mucosa throughout the body were often

418 observed. If viral infection occurred during pregnancy, this led to abortion or
419 observation of neurological defects in newborns. With BTV-8 infection, some
420 cases of “dummy” lambs were described for aborted fetuses or stillborns.
421 Abnormal development of CNS tissues was described at necropsy.⁶⁷ During
422 the bluetongue epidemic, a significant increase in bovine abortions and
423 stillborns as well as the birth of weak or deformed calves was reported.
424 “Dummy” syndrome and hydranencephaly were observed as for lambs.⁶⁸
425 Such abnormalities were detected in stillborn or newborn ruminants in case of
426 SBV infection, but they were always associated with musculoskeletal
427 deformities (arthrogryposis, scoliosis, lordosis, and/or torticollis).

428 For viral infection diagnosis, the most commonly used laboratory
429 diagnosis was genome detection by RT-PCR and/or evaluation of animal
430 seropositivity by performing ELISA or VNT. As for SBV, numerous
431 mammalian species were detected BTV-8 seropositive, but in the absence of
432 PCR-positive results, it cannot be concluded that these species are real viral
433 hosts.

434 Both for BTV-8 and for SBV, herd vaccination seemed to be the only
435 realistic preventive measure to take to prevent novel viral episode. Massive
436 compulsory vaccination campaigns against BTV-8 were conducted in
437 northern Europe,⁶⁵ while for SBV, the use of vaccines is not compulsory and
438 therefore limited. For both BTV-8 and SBV, virus surveillance in vector
439 populations could be helpful to predict hypothetical reemergence.

440 Comparatively, the impact of BTV-8 infection on ruminant health and
441 productivity was clearly higher than that of SBV. Severe clinical signs and
442 high levels of morbidity and mortality were observed in case of BTV-8
443 infection. Moreover, BTV-8 infection led to decreased semen quality in bulls
444 and rams^{69,70} as to poor reproductive performance in females.⁶⁷

445 **Conclusion**

446 In 5 years, European flocks underwent two major viral episodes: BTV-8 and
447 SBV emerged in the same regions and rapidly spread among European
448 countries. Even though they belong to different families, both arboviruses are
449 transmitted by biting midges (*Culicoides* spp.) and caused economic losses to
450 the European livestock industry. To date, too little is known about these
451 insects. Further studies could focus on life cycle, habitats, and distribution of
452 insects and the impact of meteorological conditions on their survival and
453 spread. Indeed, at a time of relatively easy control of animal movements
454 within and between countries, a better understanding of the biology and
455 ecology of these insects recognized as vectors for several animal diseases
456 seems to be of first interest.

457 For BTV and for SBV, it is clear that veterinarians played and play an
458 essential role in the early detection of clinical signs related to viral infection
459 and in the transmission of field data to health authorities. They are the first
460 players of our health surveillance networks, and in front of the risk of the
461 unpredictable emergence of novel animal pathogens, it is sure that
462 veterinarians in Europe and all around the world will act as “warning signals”.
463 But they are only part of a team effort: only strong collaborations between
464 field workers, laboratories, and authorities could lead to efficient and valuable
465 work.

466 **Disclosure**

467 None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with
468 other people or organizations that could inappropriately influence or bias the
469 content of the paper.

470 **References**

471 1. Velthuis AG, Saatkamp HW, Mourits MC, de Koeijer AA, Elbers AR.

- 472 Financial consequences of the Dutch bluetongue serotype 8 epidemics of
473 2006 and 2007. *Prev Vet Med.* 2010;93(4):294–304.
- 474 2. Koenraadt CJ, Balenghien T, Carpenter S, et al. Bluetongue,
475 Schmallerberg – what is next? *Culicoides*-borne viral diseases in the 21st
476 century. *BMC Vet Res.* 2014;10:77.
- 477 3. Larska M, Krzysiak MK, Kęsik-Maliszewska J, Rola J. Cross-sectional
478 study of Schmallerberg virus seroprevalence in wild ruminants in Poland at
479 the end of the vector season of 2013. *BMC Vet Res.* 2014;10(1):307.
- 480 4. Schulz C, Wernike K, Beer M, Hoffmann B. Infectious Schmallerberg
481 virus from bovine semen, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(2):338–340.
- 482 5. Hoffmann B, Scheuch M, Höper D, et al. Novel orthobunyavirus in cattle,
483 Europe, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(3):469–472.
- 484 6. De Regge N, Deblauwe I, De Deken R, et al. Detection of Schmallerberg
485 virus in different *Culicoides* spp. by real-time RT-PCR. *Transbound Emerg*
486 *Dis.* 2012;59(6):471–475.
- 487 7. Goffredo M, Monaco F, Capelli G, et al. Schmallerberg virus in Italy: a
488 retrospective survey in *Culicoides* stored during the bluetongue Italian
489 surveillance program. *Prev Vet Med.* 2013;111:230–236.
- 490 8. Luttikholt S, Veldhuis A, van den Brom R, et al. Risk factors for
491 malformations and impact on reproductive performance and mortality rates of
492 Schmallerberg virus in sheep flocks in the Netherlands. *PLoS One.*
493 2014;9(6):e100135.
- 494 9. De Regge N, van den Berg T, Georges L, Cay B. Diagnosis of
495 Schmallerberg virus infection in malformed lambs and calves and first
496 indications for virus clearance in the fetus. *Vet Microbiol.* 2013;162(2–
497 4):595–600.
- 498 10. ProMED-mail [homepage on the Internet]. Schmallerberg virus – Europe

499 (34): decline, update; 2012. Available from:
500 <http://www.promedmail.org/direct.php?id=1115024>. Accessed January 14,
501 2015.

502 11. Elbers AR, Loeffen WL, Quak S, et al. Seroprevalence of Schmallenberg
503 virus antibodies among dairy cattle, the Netherlands, winter 2011-2012.
504 *Emerg Infect Dis.* 2012;18(7):1065–1071.

505 12. Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N.
506 Schmallenberg virus among female lambs, Belgium, 2012. *Emerg Infect Dis.*
507 2013;19(7):1115–1117.

508 13. Conraths FJ, Kamer D, Teske K, Hoffmann B, Mettenleiter TC, Beer M.
509 Reemerging Schmallenberg virus infections, Germany, 2012. *Emerg Infect*
510 *Dis.* 2013;19(3):513–514.

511 14. ProMED-mail [homepage on the Internet]. Schmallenberg virus – Europe
512 (35): Netherlands, Germany, bovine; 2014. Available from:
513 <http://www.promedmail.org/direct.php?id=2978286>. Accessed January 14,
514 2015.

515 15. Sedda L, Rogers DJ. The influence of the wind in the Schmallenberg virus
516 outbreak in Europe. *Sci Rep.* 2013;3:3361.

517 16. Yanase T, Kato T, Aizawa M. Genetic reassortment between Sathuperi
518 and Shamonda viruses of the genus Orthobunyavirus in nature: implications
519 for their genetic relationship to Schmallenberg virus. *Arch Virol.*
520 2012;157(8):1611–1616.

521 17. Goller KV, Hoper D, Schirrmeier H, Mettenleiter TC, Beer M.
522 Schmallenberg virus as possible ancestor of Shamonda virus. *Emerg Infect*
523 *Dis.* 2012;18(10):1644–1646.

524 18. Coupeau D, Claine F, Wiggers L, Kirschvink N, Muylkens B. In vivo and
525 in vitro identification of a hypervariable region in Schmallenberg virus. *J Gen*

- 526 *Viol.* 2013;94(pt 6):1168–1174.
- 527 19. Fischer M, Hoffmann B, Goller KV, Hoper D, Wernike K, Beer M. A
528 mutation 'hot spot' in the Schmallerberg virus M segment. *J Gen Virol.*
529 2013;94(pt 6):1161–1167.
- 530 20. European Food Safety Authority [homepage on the Internet].
531 Schmallerberg virus: state of art; 2014. Available from:
532 <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/doc/3681.pdf>. Accessed January 10,
533 2015.
- 534 21. Poskin A, Martinelle L, Mostin L, et al. Dose-dependent effect of
535 experimental Schmallerberg virus infection in sheep. *Vet J.* 2014;201(3):419–
536 422.
- 537 22. Hechinger S, Wernike K, Beer M. Evaluating the protective efficacy of a
538 trivalent vaccine containing Akabane virus, Aino virus and Chuzan virus
539 against Schmallerberg virus infection. *Vet Res.* 2013;44:114.
- 540 23. Rasmussen LD, Kristensen B, Kirkeby C, et al. Culicoids as vectors of
541 Schmallerberg virus. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(7):1204–1206.
- 542 24. Elbers AR, Meiswinkel R, van Weezep E, Sloet van Oldruitenborgh-
543 Oosterbaan MM, Kooi EA. Schmallerberg virus in *Culicoides spp.* biting
544 midges, the Netherlands, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(1):106–109.
- 545 25. De Regge N, Madder M, Deblauwe I, et al. Schmallerberg virus
546 circulation in *Culicoides* in Belgium in 2012: field validation of a real time
547 RT-PCR approach to assess virus replication and dissemination in midges.
548 *PLoS One.* 2014;9(1):e87005.
- 549 26. Veronesi E, Henstock M, Gubbins S, et al. Implicating *Culicoides* biting
550 midges as vectors of Schmallerberg virus using semi-quantitative RT-PCR.
551 *PLoS One.* 2013;8(3):e57747.
- 552 27. Mellor PS. Infection of the vectors and bluetongue epidemiology in

- 553 Europe. *Vet Ital.* 2004;40:167–174.
- 554 28. Lehmann K, Werner D, Hoffmann B, Kampen H. PCR identification of
555 culicoid biting midges (*Diptera, Ceratopogonidae*) of the *Obsoletus* complex
556 including putative vectors of bluetongue and Schmallenberg viruses. *Parasit*
557 *Vectors.* 2012;5:213.
- 558 29. Sanders CJ, Shortall CR, Gubbins S, et al. Influence of season and
559 meteorological parameters on flight activity of *Culicoides* biting midges. *J*
560 *Appl Ecol.* 2011;48(6):1355–1364.
- 561 30. Burgin LE, Gloster J, Sanders C, Mellor PS, Gubbins S, Carpenter S.
562 Investigating incursions of bluetongue virus using a model of long-distance
563 *Culicoides* biting midge dispersal. *Transbound Emerg Dis.* 2013;60(3):263–
564 272.
- 565 31. Wernike K, Jost H, Becker N, Schmidt-Chanasit J, Beer M. Lack of
566 evidence for the presence of Schmallenberg virus in mosquitoes in Germany,
567 2011. *Parasit Vectors.* 2014;7:402.
- 568 32. Scholte EJ, Mars MH, Braks M, et al. No evidence for the persistence of
569 Schmallenberg virus in overwintering mosquitoes. *Med Vet Entomol.*
570 2014;28:110–115.
- 571 33. Ponsart C, Pozzi N, Bréard E, et al. Evidence of excretion of
572 Schmallenberg virus in bull semen. *Vet Res.* 2014;45:37.
- 573 34. Zientara S, Ponsart C. Viral emergence and consequences for reproductive
574 performance in ruminants: two recent examples (bluetongue and
575 Schmallenberg viruses). *Reprod Fertil Dev.* 2014;27(1):63–71.
- 576 35. Poskin A, Van Campe W, Mostin L, Cay B, De Regge N. Experimental
577 Schmallenberg virus infection of pigs. *Vet Microbiol.* 2014;170(3–4):398–
578 402.
- 579 36. Afonso A, Abrahantes JC, Conraths F, et al. The Schmallenberg virus

580 epidemic in Europe-2011-2013. *Prev Vet Med.* 2014;116(4):391–403.

581 37. Bayrou C, Garigliany MM, Sarlet M, Sartelet A, Cassart D, Desmecht D.
582 Natural intrauterine infection with Schmallerberg virus in malformed
583 newborn calves. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(8):1327–1330.

584 38. Kurogi H, Inaba Y, Goto Y, Miura Y, Takahashi H. Serologic evidence
585 for etiologic role of Akabane virus in epizootic abortion-arthrogyrosis-
586 hydranencephaly in cattle in Japan, 1972-1974. *Arch Virol.* 1975;47(1):71–83.

587 39. Tsuda T, Yoshida K, Ohashi S, et al. Arthrogyrosis, hydranencephaly
588 and cerebellar hypoplasia syndrome in neonatal calves resulting from
589 intrauterine infection with Aino virus. *Vet Res.* 2004;35(5):531–538.

590 40. Herder V, Wohlsein P, Peters M, Hansmann F, Baumgartner W. Salient
591 lesions in domestic ruminants infected with the emerging so-called
592 Schmallerberg virus in Germany. *Vet Pathol.* 2012;49(4):588–591.

593 41. Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Evidences
594 for re-emergence of Schmallerberg virus during summer and autumn 2012
595 among naïve female lambs and immunized ewes. In: Proceedings of the 7th
596 EPIZONE Annual Meeting; Oct 1-4, 2013; Brussels, Belgium.

597 42. Doceul V, Lara E, Sailleau C, et al. Epidemiology, molecular virology and
598 diagnostics of Schmallerberg virus, an emerging orthobunyavirus in Europe.
599 *Vet Res.* 2013;14:31.

600 43. Steukers L, Bertels G, Cay AB, Nauwynck H. Schmallerberg virus:
601 emergence of an Orthobunyavirus among ruminants in Western Europe.
602 *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr.* 2012;81(3):119–127.

603 44. Kirkland PD, Barry RD, Harper PA, Zelski RZ. The development of
604 Akabane virus-induced congenital abnormalities in cattle. *Vet Rec.*
605 1988;122(24):582–586.

606 45. Wernike K, Holsteg M, Schirrmeier H, Hoffmann B, Beer M. Natural

607 infection of pregnant cows with Schmallerberg virus – a follow-up study.
608 *PLoS One*. 2014;9(5):e98223.

609 46. Reusken C, van den Wijngaard C, van Beek P, et al. Lack of evidence for
610 zoonotic transmission of Schmallerberg virus. *Emerg Infect Dis*.
611 2012;18(11):1746–1754.

612 47. Fischer M, Schirrmeier H, Wernike K, Wegelt A, Beer M, Hoffmann B.
613 Development of a pan-Simbu real-time reverse transcriptase PCR for the
614 detection of Simbu serogroup viruses and comparison with SBV diagnostic
615 PCR systems. *Viol J*. 2013;10:327.

616 48. van der Poel WH. Diagnostics for Schmallerberg virus. *Vet Rec*.
617 2012;171(12):294–295.

618 49. Bilk S, Schulze C, Fischer M, Beer M, Hlinak A, Hoffmann B. Organ
619 distribution of Schmallerberg virus RNA in malformed newborns. *Vet*
620 *Microbiol*. 2012;159(1–2):236–238.

621 50. Bréard E, Lara E, Comtet L, et al. Validation of a commercially available
622 indirect elisa using a nucleocapside recombinant protein for detection of
623 Schmallerberg virus antibodies. *PLoS One*. 2013;8(1):e53446.

624 51. Humphries D, Burr P. Schmallerberg virus milk antibody ELISA. *Vet*
625 *Rec*. 2012;171(20):511–512.

626 52. van der Poel WH, Cay B, Zientara S, et al. Limited interlaboratory
627 comparison of Schmallerberg virus antibody detection in serum samples. *Vet*
628 *Rec*. 2014;174(15):380.

629 53. Tarlinton R, Daly J, Dunham S, Kydd J. The challenge of Schmallerberg
630 virus emergence in Europe. *Vet J*. 2012;194(1):10–18.

631 54. Gerhauser I, Weigand M, Hahn K, et al. Lack of schmallerberg virus in
632 ruminant brain tissues archived from 1961 to 2010 in Germany. *J Comp*
633 *Pathol*. 2014;150(2–3):151–154.

- 634 55. Elliott RM, Blakqori G, van Knippenberg IC, et al. Establishment of a
635 reverse genetics system for Schmallenberg virus, a newly emerged
636 orthobunyavirus in Europe. *J Gen Virol.* 2013;94(pt 4):851–859.
- 637 56. Carpenter S, Mellor PS, Torr SJ. Control techniques for *Culicoides* biting
638 midges and their application in the U.K. and northwestern Palaeartic. *Med*
639 *Vet Entomol.* 2008;22(3):175–187.
- 640 57. Kraatz F, Wernike K, Hechinger S, et al. Deletion mutants of
641 Schmallenberg virus are avirulent and protect from virus challenge. *J Virol.*
642 2015;89(3):1825–1837.
- 643 58. Elbers AR, Stockhofe-Zurwieden N, van der Poel WH. Schmallenberg
644 virus antibody persistence in adult cattle after natural infection and decay of
645 maternal antibodies in calves. *BMC Vet Res.* 2014;10:103.
- 646 59. Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Passive
647 immunity against Schmallenberg virus in lambs. 0000.
- 648 60. Martinelle L, Dal Pozzo F, Gauthier B, Kirschvink N, Saegerman C. Field
649 veterinary survey on clinical and economic impact of Schmallenberg virus in
650 Belgium. *Transbound Emerg Dis.* 2014;61(3):285–288.
- 651 61. Saegerman C, Martinelle L, Dal Pozzo F, Kirschvink N. Preliminary
652 survey on the impact of Schmallenberg virus on sheep flocks in South of
653 Belgium. *Transbound Emerg Dis.* 2014;61(5):469–472.
- 654 62. Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N. Emergence
655 and time course of spreading of Schmallenberg virus in late summer 2011 in a
656 Belgian naïve sheep flock. In: Proceedings of the 7th EPIZONE Annual
657 Meeting; Oct 1-4, 2013; Brussels, Belgium.
- 658 63. Veldhuis AM, Santman-Berends IM, Gethmann JM, et al. Schmallenberg
659 virus epidemic: impact on milk production, reproductive performance and
660 mortality in dairy cattle in the Netherlands and Kleve district, Germany. *Prev*

- 661 *Vet Med.* 2014;116(4):412–422.
- 662 64. Saegerman C, Mellor P, Uyttenhoef A, et al. The most likely time and
663 place of introduction of BTV8 into Belgian ruminants. *PLoS One.*
664 2010;5(2):e9405.
- 665 65. Leemans J, Hamers C, Chery R, et al. Interference of colostral antibodies
666 with response to a Bluetongue serotype 8 inactivated vaccine in lambs born
667 from hyperimmune ewes. *Vaccine.* 2013;31(15):1975–1980.
- 668 66. Menzies FD, McCullough SJ, McKeown IM, et al. Evidence for
669 transplacental and contact transmission of bluetongue virus in cattle. *Vet Rec.*
670 2008;163:203–209.
- 671 67. Saegerman C, Bolkaerts B, Baricalla C, et al. The impact of naturally-
672 occurring, trans-placental bluetongue virus serotype-8 infection on
673 reproductive performance in sheep. *Vet J.* 2011;187(1):72–80.
- 674 68. Vercauteren G, Miry C, Vandebussche F, et al. Bluetongue virus
675 serotype 8-associated congenital hydranencephaly in calves. *Transbound*
676 *Emerg Dis.* 2008;55:293–298.
- 677 69. Kirschvink N, Raes M, Saegerman C. Impact of a natural bluetongue
678 serotype 8 infection on semen quality of Belgian rams in 2007. *Vet J.*
679 2009;182(2):244–251.
- 680 70. Muller U, Kemmerling K, Straet D, Janowitz U, Sauerwein H. Effects of
681 bluetongue virus infection on sperm quality in bulls: a preliminary report. *Vet*
682 *J.* 2010;186(3):402–403.
- 683 71. Alexander KA, MacLachlan NJ, Kat PW, et al. Evidence of natural
684 bluetongue virus among African carnivores. *Am J Trop Med Hyg.*
685 1994;51:568–576.
- 686 72. Jauniaux TP, De Clercq KE, Cassart D, et al. Bluetongue in Eurasian
687 Lynx. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(9):1496–1498.

689

690 **Table 1** Mammalian species susceptible to SBV and classified following
 691 possible way(s) of identification of viral infection for each of them: clinical
 692 signs in adult animals and/or neonates, direct pathogen detection (SBV
 693 genome) by real-time polymerase chain reaction, and indirect pathogen
 694 detection (anti-SBV antibodies) by neutralization test or enzyme-linked
 695 immunosorbent assay²⁰

Species	Clinical signs	Direct pathogen detection (SBV genome)	Indirect pathogen detection (anti-SBV antibodies)
Alpaca		x	x
Buffalo		x	x
Bison		x	x
Camelid			x
Cattle	x (A and N)	x	x
Chamois			x
Dog		x	x
Elk			x
Fallow deer			x
Goat	x (rare)	x	x
Horse			x
Mouflon			x
Muntjac			x
Red deer			x
Roe deer			x

Sheep	x (N)	x	x
Sika deer			x
Wild boar			x

696 **Note:** The 19 tested SBV-seropositive zoo species are not presented in this
697 table.

698 **Abbreviations:** SBV, Schmallenberg virus; A, animals; N, neonates.

699

700 **Table 2** Comparison between BTV-8 and SBV

	BTV-8	SBV
Virus classification (family, genus)	<i>Reoviridae, Orbivirus</i> ⁶⁴	<i>Bunyaviridae, Orthobunyavirus</i> ⁵
Viral genome	Double-stranded virus	Negative-sense single-stranded virus
Time of first detection	August 2006 ⁶⁴	August 2011 ⁵
Places of first detection	Germany – The Netherlands – Belgium ⁶⁴	Germany – The Netherlands – Belgium ⁵
Number of European affected countries at the end of the epidemic	9 (Belgium, Czech Republic, Denmark, France, Germany, Luxemburg, The Netherlands, Switzerland, UK) ⁶⁴	27 (Figure 1) ¹⁴
Transmission routes	Vector transmission ⁶⁴	Vector transmission ⁶
	Transplacental transmission ⁶⁶	Transplacental transmission ⁴²
	Venereal transmission ^{69,70}	Venereal transmission ^{4,33}
	Placentophagia ⁶⁶	
Vectors	Insects: <i>Culicoides</i> spp. ⁶⁴	Insects: <i>Culicoides</i> spp. ⁶
Susceptible	Domestic ruminants	Domestic ruminants (cattle,

species	(cattle, sheep, goat)	sheep, goat)
	Wild ruminants (eg, deer, elk)	Wild ruminants (eg, buffalo, deer, elk)
	Carnivores species ^{71,72}	Other mammalian species (eg, dog, horse, wild boar)
Clinical signs	Adult animals ⁶⁷	Adult animals (mainly in cattle and sheep) ¹⁵
	Nasal discharge	Hyperthermia
	Excessive salivation	Inappetence
	Subcutaneous edema (particularly on the head)	Diarrhea
		Drop in milk production
	Ulceration of the oral mucosa	Abortions
	Cyanosis of the tongue	
	Abortions	
	Aborted fetuses and newborns (essentially in sheep) ⁶⁷	Aborted fetuses and newborns (mainly in cattle and sheep) ⁴⁰
	Neurological deficits (“dummy” lamb)	Arthrogryposis
		Scoliosis, lordosis, torticollis
	Brachygnathia superior	Brachygnathia inferior
	Hydranencephaly	Hydranencephaly, cerebellum and/or cerebrum aplasia, or hypoplasia
	Hydrocephalus	
	Porencephaly,	

	cerebellum and/or cerebrum aplasia, or hypoplasia	
Duration of viremia	Until 5–14 days postinfection (experimental) ⁶⁵	Until 2–5 days postinfection (experimental) ⁵
Common laboratory diagnosis	Observation of clinical signs	Observation of clinical signs
	Direct (BTV genome): RT-PCR	Direct (SBV genome): RT-PCR
	Indirect (anti-BTV antibodies): ELISA and VNT	Indirect (anti-SBV antibodies): ELISA and VNT
Prevention	Vaccination ⁶⁵	Vaccination ⁵⁸
Impact on ruminant health and productivity	Important ⁶⁷	Low or limited ⁴²

701 **Abbreviations:** BTV-8, bluetongue virus serotype 8; SBV, Schmallenberg
702 virus; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction; ELISA, enzyme-linked
703 immunosorbent assay; VNT, virus neutralization test.

704

705 **Figure 1** European countries having reported cases of SBV infection in cattle,
706 sheep, or goat herds or having detected antibodies in serum or milk between
707 summer 2011 and late autumn 2014 presented as a cumulative list (A) and
708 colored on a map (B).

709 **Abbreviation:** SBV, Schmallenberg virus.

710

711 **Figure 2** Schmallenberg virus infection in stillborn lambs presenting
712 arthrogryposis, scoliosis, and torticollis (A), brachygnathia inferior (B), and
713 cerebellar/cerebral hypoplasia (C).

714

715 **Figure 3** Bluetongue virus serotype 8 infection in stillborn lambs presenting
716 arthrogryposis (A), brachygnathia superior and anophthalmia (B), and
717 cerebellar hypoplasia (C).

718

719 **Figure 4** Diagnosis of SBV infection by observation of clinical signs in adult
720 animals and aborted fetuses, stillborns, or newborns, and by performing most
721 commonly used laboratory ways of diagnosis.

722 **Notes:** ELISA and VNT allows to detect anti-SBV antibodies and are thus
723 considered as indirect tools of diagnosis, while RT-PCR allows direct
724 diagnosis because of detection of SBV genome in biological samples.

725 **Abbreviations:** SBV, Schmallenberg virus; ELISA, enzyme-linked
726 immunosorbent assay; VNT, virus neutralization test; RT-PCR, real-time
727 polymerase chain reaction.

728

729

Accepted Manuscript

Title: Modelling the evolution of Schmallenberg virus seroprevalence in a sheep flock after natural infection

Authors: François Claine, Damien Coupeau, Laetitia Wiggers, Benoît Muylkens, Nathalie Kirschvink



PII: S0167-5877(17)30558-5
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.03.024>
Reference: PREVET 4444

To appear in: *PREVET*

Received date: 2-8-2017
Revised date: 21-3-2018
Accepted date: 30-3-2018

Please cite this article as: Claine F, Coupeau D, Wiggers L, Muylkens B, Kirschvink N, Modelling the evolution of Schmallenberg virus seroprevalence in a sheep flock after natural infection, *Preventive Veterinary Medicine* (2010), <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.03.024>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Modelling the evolution of Schmallenberg virus seroprevalence in a sheep flock after natural infection

François Claine¹, Damien Coupeau, Laetitia Wiggers, Benoît Muylkens, Nathalie Kirschvink

Department of Veterinary Medicine, Pole of Infectiology, University of Namur

Rue de Bruxelles 61, 5000 Namur, Belgium.

Final corresponding author: nathalie.kirschvink@unamur.be

¹ Present address: Association Régionale de Santé et d'Identification Animales (Arsia)

Allée des Artisans 2, 5590 Ciney, Belgium.

1. Introduction

In autumn 2011, the first clinical evidence of Schmallenberg virus (SBV) infection was reported among cattle herds in Germany and in the Netherlands. This novel arbovirus belonging to the genus *Orthobunyavirus* and the family *Bunyaviridae* was responsible for a mild transient disease characterized by hyperthermia, diarrhea and drop of milk production (Hoffmann et al., 2011). Within the next months, an epizootic outbreak of congenital deformities, featuring an arthrogryposis-hydranencephaly syndrome, was observed in still- or newborns (calves, lambs and kids) in Germany, the Netherlands and neighboring countries (Luttikholt et al., 2014). These malformations were clearly associated with transplacental SBV infection. In early spring 2012,

the total number of affected herds equaled 3,628 in eight Western European countries (bovine 1,115, ovine 2,440, caprine 73) (ProMED-mail SBV Europe 34, 2012). Novel episodes of SBV infection were observed in 2012 in Belgium, the Netherlands, Germany, United Kingdom and France. In 2013, SBV spread to Eastern Europe and, in late 2013, a total of 27 European countries were considered as “SBV-infected” (ProMED-mail SBV Europe 35, 2014). *Culicoides* biting midges, small hematophagous Diptera from family *Ceratopogonidae*, have been identified as putative vectors of the virus that probably explained the rapid and wide expansion of SBV (Rasmussen et al., 2012). In late 2014, a third very mild episode of viral infection was reported in Germany and in the Netherlands (Wernike et al., 2015a). Even though three SBV episodes occurred in Europe since 2011, the case numbers of SBV-infected herds largely decreased from 2012 to 2013 and 2014. More recently, evidences of SBV reoccurrence were detected in Belgium: an eight-month-old malformed bovine fetus was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) positive suggesting the virus had circulated during autumn 2015 (Delooz et al., 2016).

The research sheep flock of the Ovine Research Center (ORC) belonging to the University of Namur underwent SBV infection in summer 2011 leading to 98% SBV seroprevalence (417 of 422 sheep were tested positive by Virus Neutralization Test (VNT)). Although no clinical evidence of SBV infection was detected among animals at the time of viral emergence, congenital deformities were observed in still- or newborn lambs during the lambing periods of January and March 2012. By mid-July 2012, a novel SBV episode was detected by Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) and VNT in 50 female lambs (Claine et al., 2013). This SBV re-emergence led to an immune booster effect among seropositive sheep and immunization of seronegative animals. Compared to what it had been observed in this research sheep flock, two cross-sectional studies conducted in Belgian cattle population during winter 2011-2012 showed at the end of 2011, almost the whole population had already been

infected by SBV. Interestingly, the level of immunity against SBV of the infected animals evaluated during one year remained high while seroprevalence in calves estimated during winter 2012-2013 dropped to 20% suggesting the appearance of age cohorts of unprotected animals after loss of colostral protection (Méroc et al., 2015). The duration of active immunity in adult animals and colostral protection in young ruminants are supposed to impact on SBV reoccurrence in the coming years. Since late 2012, in contrast to what has been observed in Germany or in the Netherlands (Wernike et al., 2015a), bimonthly investigation of naïve sentinel sheep at ORC did not provide serological evidence of novel SBV circulation (Claine, Personal communication). This absence of novel SBV episodes led to an increase number of seronegative animals as soon as passive immunity conferred by colostrum against SBV disappeared.

Due to annual flock renewal and an increased number of seronegative animals, viral re-emergence might be expected as mentioned in case of infection with arboviruses related to SBV (e.g. Akabane virus, AKAV) (Kirkland, 2015). At this time, poor information is available about the long-term evolution of SBV seropositivity within a sheep flock after natural viral infection. The objectives of this study were (1) to estimate the duration of colostral protection in lambs and the persistence of active immunity in adult sheep and (2) to model the evolution of SBV seroprevalence in a sheep flock by considering young and adult sheep immune status as well as zootechnical parameters (flock renewal and prolificacy). Such a long-time serological monitoring is unique in a sheep herd to our knowledge and potentially allows the prediction of within-herd seroprevalence evolution.

2. Material and Methods

2.1 Animals

The research sheep flock of the ORC is composed to around 400 ewes producing around 600 lambs a year. This center belonging to the University of Namur is located in the southern part of Belgium. The entire flock was used for this study from January 2012 until December 2016 according to the experimental design described by **figure 1**. The investigation protocols were approved by the Ethical Committee for Animal Welfare of the University of Namur (projects 12/185 and 13/192).

SBV seroprevalence was evaluated at a herd scale in January 2013 (n=749) and December 2015 (n=547) while the monitoring of SBV circulation was performed by using 20 sentinel ewe lambs from January 2012 until December 2016. These sentinel animals were renewed each year and bimonthly blood collected during their evaluation period.

In order to describe the course of maternally-derived antibodies and the transfer of passive immunity from dams to lambs, a total of 60 lambs was used. Group L12 lambs (n=30) were born in 2012 (January n=10; March n=10 and May n=10) from ewes (n=25) that underwent natural SBV infection in autumn 2011. Group L13 lambs (n=30) were born in 2013 (January n=10; March n=10 and June n=10) from ewes (n=25) that underwent two SBV episodes. In lambs, serum was collected at birth (t₀), 48 hours after first colostrum ingestion (t₄₈) and then bimonthly until 150 days after birth (DAB). Serum and colostrum were collected in ewes at lambing time. For the first two days after birth, lambs were housed with their ewes to ensure colostrum intake by natural suckling.

In order to evaluate long-term immunity in adult animals, a total of 20 ewes was used. These animals were blood collected yearly from early 2012 until late 2015. All these ewes were present in the flock during SBV emergence in late 2011 and the second SBV episode during summer 2012.

2.2 *Virus Neutralization Test (VNT)*

Blood or colostrum samples were centrifuged at 1,100xg for 25 minutes at room temperature. Colostrum's lipid layer was removed to isolate lactoserum. Serum samples were heat inactivated. (Lacto) serum samples were 12 times two-fold diluted in Minimum Essential Medium, starting at ½ in 96-well plates. Approximately 100-200 TCID₅₀ SBV (isolate SBV-BH80/11-4) were then added to each diluted serum before overnight incubation at 37 °C. Results of VNT were expressed as the effective dilution neutralizing 50% of the challenge virus (ED₅₀) and were considered positive if log₂ ED₅₀ was > 3.49.

2.3 Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

RT-qPCR used was developed at the Friedrich Loeffler Institute (Hoffmann et al., 2012) and performed on total RNA extracted from serum stored at -80°C. The data were respectively expressed as cycle threshold (Ct) and considered positive at Ct<40.

2.4 Mathematical model

In order to model the evolution of SBV seroprevalence in the absence of viral circulation, the flock renewal rate was considered as factor affecting the number of SBV seropositive adults and lambs. In a fixed model characterized by a constant number of reproductive ewes, the number of seropositive adult animals and seropositive lambs respectively equaled:

$$\text{Number of SBV seropositive adults}_y = \text{number of adults}_y - x * (\text{number of adults}_z * \text{renewal rate})$$

$$\text{Number of SBV seropositive lambs}_y = \text{prolificacy} * \text{number of SBV seropositive adults}_y$$

In these equations, “y” represents the year of SBV seropositivity assessment, “z” represents the year of last SBV infection and “x” the length of time (expressed in years) between “z” and “y”.

2.5 Statistical analysis

SIGMAPLOT® software was used to statistical analysis. Prior to analysis, data were tested for homogeneity of variance and for normal distribution. Non-parametric methods (Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests) were used to compare antibody levels in selected groups and

estimated times to reach seronegativity between lambs. The level of significance was set to $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Passive immunity in lambs

At birth, undetectable levels of anti-SBV neutralizing antibodies were found in 100% of lambs (60/60). Forty-eight hours after first colostrum intake, median (min-max) \log_2 ED50 anti-SBV antibody titers equaled 9.47 (6.98-10.97) for group L12 animals and 10.46 (8.47-12.46) for group L13 animals and differed significantly ($P < 0.05$) (**figure 2**). No significant lambing period-related differences were detected within groups L12 and L13 (data not shown).

In ewes, a significant increase of anti-SBV antibody titers was observed in colostrum samples between 2012 and 2013 ($P < 0.05$). These median (min-max) \log_2 ED50 titers equaled 11.46 (9.47-12.46) in 2012 and 12.46 (10.96-12.46) in 2013. As for lambs, no lambing period-effect was detected in 2012 or in 2013. However, no year-related significant difference was observed in serum. Finally, amounts of anti-SBV antibodies did not show any significant difference between primiparous ewes aged from 13 to 17 months and multiparous ewes in both serum and colostrum samples (data not shown).

The duration of passive immunity in those lambs was defined as the time for lambs to become seronegative (\log_2 ED50 < 3.49) after ingestion and absorption of colostrum. This median (min-max) time was significantly lower for lambs born in 2012 (81 days; 69-132) than for lambs born in 2013 (122 days; 74-144) ($P > 0.05$) (**figure 3a-b**), suggesting a booster effect of SBV reemergence on anti-SBV immune status.

3.2 Long-term immunity in adult animals

As shown in **figure 4**, all the adult ewes remained seropositive from early 2012 until late 2015. The anti-SBV antibody titers expressed as median (min-max) \log_2 ED50 increased significantly

between early 2012 (8.47 [6.48-9.47]) and early 2013 (9.47 [6.96-10.96]); ($P < 0.05$). From early 2014 until late 2015, no significant differences were observed between anti-SBV antibody titers that min-max ranged from 6.47 to 8.47. However, those titers remained significantly lower than those evaluated in early 2012 and early 2013 ($P < 0.05$).

3.3 Modelling SBV seroprevalence evolution at a herd scale

Based on results obtained above, SBV seroprevalence evolution at a herd scale was estimated. Since January 2013 until December 2015, the number of SBV seropositive and seronegative animals present at ORC was monthly evaluated. The farm register provided information about entries (newborn lambs) and exits (sold lambs or ewes). The decision tree summarized in **figure 5** was used. Each animal over four months and born before the time of SBV re-emergence (summer 2012) was considered as SBV seropositive as well as lambs born to these ewes that were younger than four months. The rest of the sheep flock was considered SBV seronegative. Based on these considerations, the evolution of SBV seropositive and seronegative sheep (adults and lambs) was then described. A large decrease of SBV seropositivity was predicted within the sheep herd: although the percentage of SBV seropositive animals equaled 89.9% (673/749) in January 2013, it was calculated to drop to 33.8% (185/547) in December 2015 (**figure 6a-b**). The accuracy of this prediction was assessed by VNT experiment performed on serum samples collected on the entire sheep flock in December 2015. VNT results were compared to predicted immune status for each animal (lamb or adult). It appeared that 99.0% (541/547) of the expected results were confirmed by VNT (**table 1**), indicating that the duration of colostrum protection and the persistence of active immunity could be applied at a herd scale.

By applying the mathematical model described above and modifying values of the renewal rate, the time for a SBV seropositive sheep flock to reach total SBV seronegativity and so high susceptibility to novel viral episode can be estimated. It was found that an annual 24.0%

renewal rate (as calculated for the research sheep flock of the ORC) led to total SBV seronegativity in 50 months after time of SBV incursion while renewal rates of 14.0% and 34.0% led to seronegativity within 86 and 35 months respectively (**figure 7**).

3.4 Follow-up of sentinel ewe lambs: monitoring of SBV episode in summer 2016

Among the sentinel ewe lambs, the first RT-qPCR positive results were obtained in mid-August: 70% (14/20) were tested positive with a mean Cq equaled to 32.02 (min 26.81 – max 38.90). In mid-September, all the monitored lambs were tested SBV seropositive by VNT. Median (min-max) \log_2 ED50 anti-SBV antibody titers equaled 9.47 (3.49-10.97) (data not shown). During the period of monitoring, no clinical sign was detected among these sentinel animals.

4. Discussion

The aims of this study were first to evaluate the duration of colostral protection in lambs and the persistence of active immunity in adult sheep and then to describe the evolution of SBV seroprevalence in a sheep flock that encountered two viral episodes. As previously mentioned, the research sheep flock of the ORC faced a first episode of SBV circulation in late summer 2011 leading to high within-flock SBV seroprevalence and evidence of SBV transplacental infection during the following lambing periods. In mid-July 2012, a second SBV circulation period was assessed in the same flock promoting a booster effect on immune status (Claine et al., 2013). This booster effect was confirmed in serum and colostrum samples collected in lambs and their ewes respectively at the time of lambing as described in this study. Even if the quantity of colostrum ingested by each lamb was not evaluated, all lambs born in 2013 presented higher levels of anti-SBV antibodies after colostrum ingestion than those born in 2012 and amounts of antibodies in colostrum samples collected in 2013 were significantly higher. Those parameters affected the decay of colostral antibodies in lambs: the time for a lamb to reach seronegativity

was increased in 2013 by ~40 days in comparison to 2012. Consequently, the duration of colostral immunity against SBV in lambs was estimated to last approximately four months. These results are in line with those of Elbers et al (2014) describing a very similar evolution of VNT-assessed SBV antibody decay in calves: the maternally-derived antibodies were lost after 5-6 months. In the same study, Elbers et al. (2014) showed adult dairy cows still had measurable antibodies against SBV at least 24 months after the estimated introduction of the virus into the herd. A similar study led in Germany by Wernike et al. (2015b) demonstrated SBV-specific antibodies were detected in dairy cattle at least three years after viral infection. In adult sheep, our results showed that natural SBV infection led to the development of active immunity able to persist at least four years after natural infection. Experimental SBV-infection in sheep provide evidence for an active immunity lasting at least two years (Poskin et al, 2016). Our findings suggest that the active immunity acquired by sheep after a natural SBV infection could be sufficient to prevent SBV reinfection. In dairy cattle, Wernike et al. (2015) assessed a lifelong antibody-based immunity could not be expected in every animal. Moreover, variable degrees of seroconversion were obtained after SBV infection so that vaccination could be a valuable tool to afford a more uniform and predictable herd protection (Rodriguez-Prieto et al. (2014). From late 2012 to late 2015, no serological evidence of SBV circulation was obtained in this research sheep flock suggesting SBV circulation was strictly limited or absent. The lack of RT-qPCR positive results in SBV suspected aborted fetuses (lambs and calves) submitted to the national reference laboratory in Belgium during the same period confirms this hypothesis (Poskin et al., 2016). Flock renewal due to normal farm management practices and the fact that vaccines against SBV were not or only rarely used among ruminants in Belgium were supposed to increase the risk of new SBV infection (Poskin et al., 2016). Indeed, the seronegative part of the domestic ruminant livestock is expected to increase yearly as soon as colostral protection against SBV disappears promoting viral re-emergence as observed for AKAV (Akabane virus)

with an interval of four to six years (Kono et al., 2008). Our results obtained at a herd scale seem to be in contradiction with those presented by Sohier et al. (2017a) at a country level where no seroprevalence decrease occurred between 2014 and 2015 in the Belgian sheep population. This difference might be attributed to different analytical techniques (ELISA versus VNT), sampling bias and the fact that ORC, located in the province of Namur (Southern part of Belgium) belonged in 2014 to the regions with the lowest SBV circulation and consequently with the lowest seroprevalence.

The evolution of within-herd SBV seroprevalence described in this study considered an annual 24.0% renewal rate and reached a level of total seronegativity after 50 months, i.e. approximately 4 years after the last natural infection. This is in line with replacement rates used in commercial farms (Lievaart-Peterson et al., 2015). The accuracy of our prediction was confirmed by VNT results of the entire sheep flock performed at the end of the study period (December 2015). In Belgian cattle population, if virus circulation was strongly reduced in 2013-2014, evidence of SBV recirculation in 2015 and 2016 increased earlier than in sheep populations (Poskin et al., 2016; Sohier et al., 2017b). This more rapid viral resurgence in cattle herds could be explained by higher renewal rates applied to bovine populations (Roche et al., 2001) and lower reporting of SBV cases in sheep.

The increased number of seronegative animals observed yearly in the ORC sheep flock suggests high within-flock susceptibility to novel SBV infection. This hypothesis was verified by the serological monitoring of sentinel ewe lambs. SBV re-emergence was assessed in those lambs by RT-qPCR and VNT showing SBV re-emergence with infection of almost all naïve sheep occurred within less than 20 days in mid-August 2016. Such a rapid SBV spread was also observed in 2011 during the first SBV episode and in 2012 during the second SBV episode in this sheep flock underlining the rapid spread in a naïve ruminant population (Claine et al., 2013).

5. Conclusion

Based on VNT-assessed antibody titers against SBV it was shown that in naturally SBV-infected sheep active immunity of adult ewes lasts at least four years. Colostral SBV antibodies of lambs born to SBV-positive ewes were detectable during four months. A combination of these findings and flock management data recorded between 2012 and 2015 was used to establish a model predicting the evolution of SBV seroprevalence at the flock scale. Seroprevalence estimation by considering herd renewal rates is of interest to plan vaccination strategies and to predict reinfection rates in case of reemergence of SBV.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has any relationship with people or organizations that could influence or bias the content of the paper.

Acknowledgments

The authors thank Benoît Bolkaerts, Christine Baricalla, and Nicolas Noel for their helpful technical assistance with animals.

References

Claine, F., Coupeau, D., Wiggers, L., Muylkens, B., Kirschvink, N., 2013. Schmallerberg virus among female lambs, Belgium, 2012. *Emerg Infect Dis.* 19(7), 1115–1117.

Claine, F., Prevot, C., Coupeau, D., Wiggers, L., Muylkens, B., Kirschvink, N., Personal communication. Schmallerberg virus in sheep: evolution of flock susceptibility over years.

Proceedings of the Annual Meeting (2015) of the Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine.

Delooz, L., Saegerman, C., Quinet, C., Petitjean, T., De Regge, N., Cay, B., 2016. Resurgence of Schmallenberg Virus in Belgium after 3 years of epidemiological silence. *Transbound Emerg Dis*. doi:10.1111/tbed.12552.

Elbers, A.R., Stockhofe-Zurwieden, N., van der Poel, W.H., 2014. Schmallenberg virus antibody persistence in adult cattle after natural infection and decay of maternal antibodies in calves. *BMC Vet Res*. 10, 103.

Hoffmann, B., Scheuch, M., Höper, D., Jungblut, R., Holsteg, M., Schirrmeier, H., Eschbaumer, M., Goller, K.V., Wernike, K., Fischer, M., Breithaupt, A., Mettenleiter, T.C., Beer, M., 2012. Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. *Emerg Infect Dis*. 18(3), 469–472.

Kirkland, P.D., 2015. Akabane virus infection. *Rev Sci Tech*. 34(2), 403-410.

Kono, R., Hirata, M., Kaji, M., Goto, Y., Ikeda, S., Yanase, T., Kato, T., Tanaka, S., Tsutsui, T., Imada, T., Yamakawa, M., 2008. Bovine epizootic encephalomyelitis caused by Akabane virus in southern Japan. *BMC Vet Res*. 4, 20.

Lievaart-Peterson, K., Lutikholt, S., Peperkamp, K., Van den Brom, R., Vellema, P., 2015. Schmallenberg disease in sheep or goats: Past, present and future. *Vet. Mic*. 181, 147-153.

Lutikholt, S., Veldhuis, A., van den Brom, R., Lammert, M., Lievaart-Peterson, K., Peperkamp, K., van Schaik, G., Vellema, P., 2014. Risk factors for malformations and impact on reproductive performance and mortality rates of Schmallenberg virus in sheep flocks in the Netherlands. *PLoS One*. 9(6), e100135.

Méroc, E., Poskin, A., Van Loo, H., Van Driessche, E., Czaplicki, G., Quinet, C., Riocreux, F., De Regge, N., Caij, B., van den Berg, T., Hooyberghs, J., Van der Stede, Y., 2015. Follow-up

of the Schmallenberg virus seroprevalence in Belgian cattle. *Transbound Emerg Dis.* 62, e80–e84.

Poskin, A., Théron, A., Hanon, J.B., Saegerman, C., Vervaeke, M., Van der Stede, Y., Cay, B., De Regge, N., 2016. Reconstruction of the Schmallenberg virus epidemic in Belgium: Complementary use of disease surveillance approaches. *Vet Microbiol.* 183, 50–61.

ProMED-mail [homepage on the Internet]. Schmallenberg virus – Europe (34): decline, update; 2012. Available from: <http://www.promedmail.org/direct.php?id=1115024>. Accessed January 16, 2017.

ProMED-mail [homepage on the Internet]. Schmallenberg virus – Europe (35): Netherlands, Germany, bovine; 2014. Available from: <http://www.promedmail.org/direct.php?id=2978286>. Accessed January 16, 2017.

Rasmussen, L.D., Kristensen, B., Kirkeby, C., Bruun Rasmussen, T., J. Belsham, G., Bodker, R., Botner, A., 2012. Culicoids as vectors of Schmallenberg virus. *Emerg Infect Dis.* 18(7), 1204–1206.

Roche, B., Dedieu, B., Ingrand, S., 2001. Relationship between practices and troop renewal rates in Limousin beef cattle herds. *INRA Prod. Anim.* 14, 255-263.

Rodriguez-Prieto, V., Kukielka, D., Mourino, M., Paradell, H., Plaja, L., Urniza, A., Sanchez-Vizcaino, J.M., 2014. Natural Immunity of Sheep and Lambs against the Schmallenberg Virus Infection. *Transbound Emerg Dis.* 63, e220–e228.

Sohier, C., Michiels, R., Kapps, E., Van Mael, E., Quinet, C., Cay, A.B., De Regge, N., 2017a. Unchanged Schmallenberg virus seroprevalence in the Belgian sheep population after the vector season of 2014 and 2015 despite evidence of virus circulation. *Res Vet Sci.* doi: 10.1016/j.rvsc.2017.04.011.

Sohier, C., Deblauwe, I., Van Loo, T., Hanon, J.B., Cay, A.B., De Regge, N., 2017b. Evidence of extensive renewed Schmallenberg virus circulation in Belgium during summer of 2016 - increase in arthrogryposis-hydranencephaly cases expected. *Transbound Emerg Dis.* 64(4), 1015-1019.

Wernike, K., Hoffmann, B., Conraths, F.J., Beer, M., 2015a. Schmallenberg Virus Recurrence, Germany, 2014. *Emerg Infect Dis.* 21(7), 1202-1204.

Wernike, K., Holsteg, M., Sasserath, M., Beer, M., 2015b. Schmallenberg virus antibody development and decline in a naturally infected dairy cattle herd in Germany, 2011-2014. *Vet Microbiol.* 181 (3-4), 294-297.

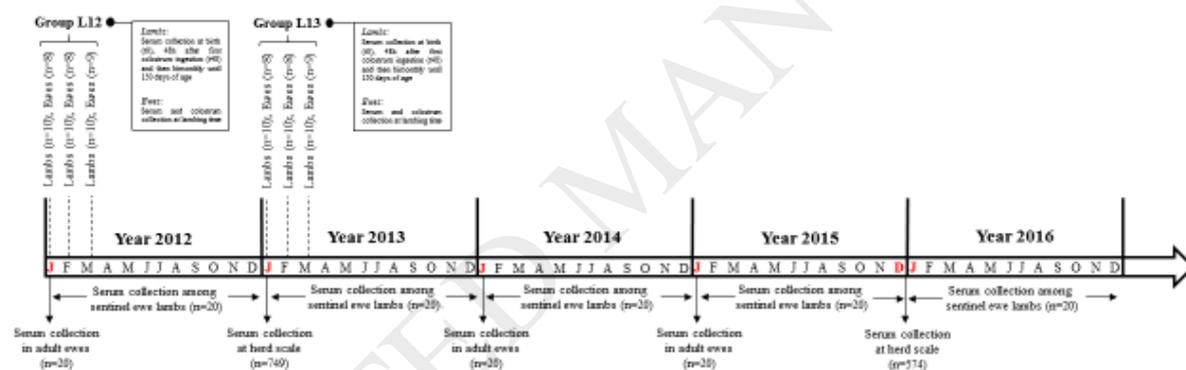


Fig. 1 Experimental design (for details, refer to Material and Methods section).

Fig. 1 Experimental design (for details, refer to Material and Methods section).

Figure 2

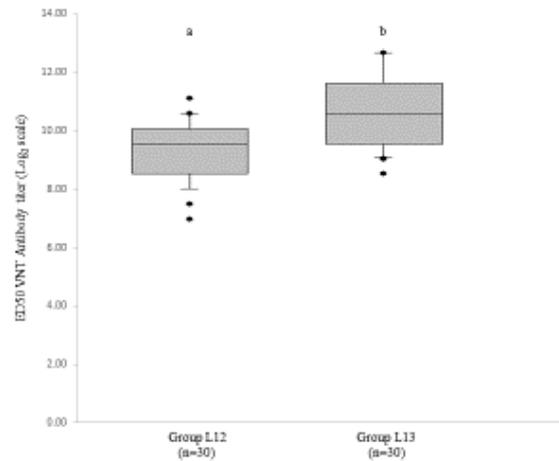


Fig. 2 Amount of anti-SBV antibody titers in lambs born in 2012 (Group L12; n=30) and in 2013 (Group L13; n=30) 48 hours after first colostrum ingestion. Data are expressed as median (min-max) \log_2 efficient dilution leading to 50% neutralisation of the challenge virus (ED50) and summarized by a box and whisker plot (the central line in the box plot indicates the median of the data, while the edges of the box indicate the 25th and 75th percentiles; extending from the box are whiskers, the top whisker expands to the 90th percentile and the bottom whisker to the 10th percentile; beyond the whiskers are observations that are relatively far from the median).
a and b differ significantly ($P < 0.05$)

Fig. 2 Amount of anti-SBV antibody titers in lambs born in 2012 (Group L12; n=30) and in 2013 (Group L13; n=30) 48 hours after first colostrum ingestion. Data are expressed as median (min-max) \log_2 efficient dilution leading to 50% neutralisation of the challenge virus (ED50) and summarized by a box and whisker plot (the central line in the box plot indicates the median of the data, while the edges of the box indicate the 25th and 75th percentiles; extending from the box are whiskers, the top whisker expands to the 90th percentile and the bottom whisker to the 10th percentile; beyond the whiskers are observations that are relatively far from the median).
a and b differ significantly ($P < 0.05$)

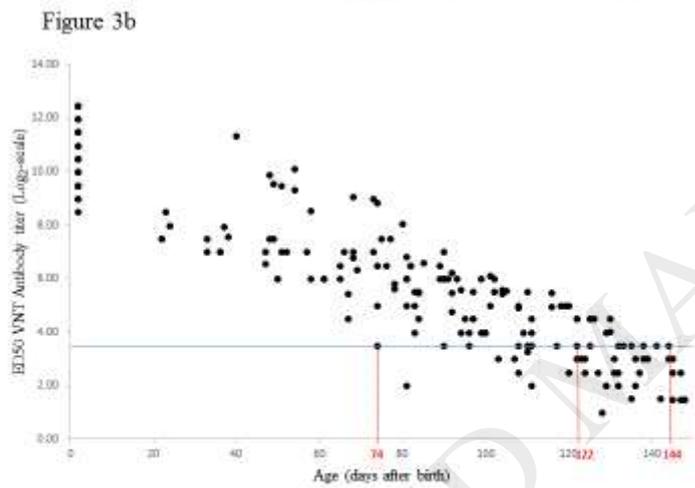
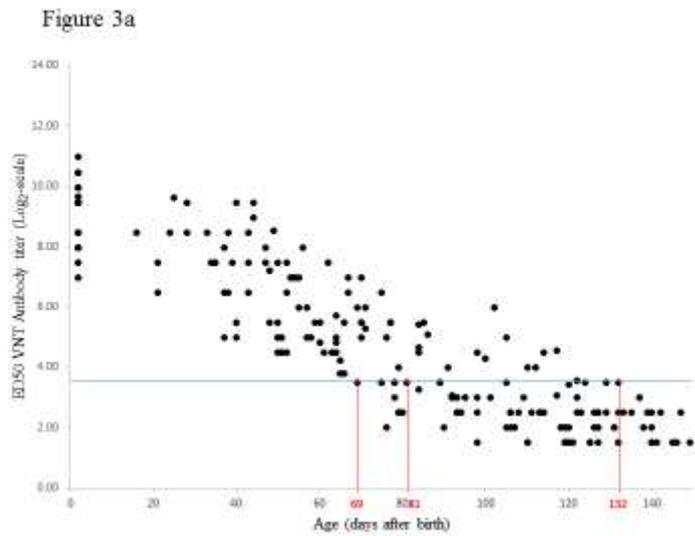


Fig. 3 Time-course of maternally-derived anti-SBV antibodies in lambs born in 2012 from ewes that underwent SBV emergence ($n=30$) (2a) and in lambs born in 2013 from ewes that underwent two SBV episodes ($n=30$) (2b) expressed as the median (min-max) age in days at which the lambs became seronegative. Amounts of anti-SBV antibodies are expressed as \log_2 efficient dilution leading to 50% neutralisation of the challenge virus (ED50).

Fig. 3 Time-course of maternally-derived anti-SBV antibodies in lambs born in 2012 from ewes that underwent SBV emergence ($n=30$) (2a) and in lambs born in 2013 from ewes that underwent two SBV episodes ($n=30$) (2b) expressed as the median (min-max) age in days at which the lambs became seronegative. Amounts of anti-SBV antibodies are expressed as \log_2 efficient dilution leading to 50% neutralisation of the challenge virus (ED50).

Figure 4

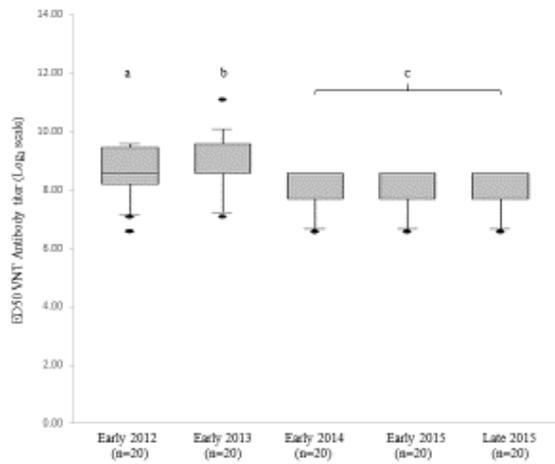


Fig.4 Evolution of anti-SBV antibody titers over years among ewes that underwent SBV emergence in late 2011 and SBV novel episode during summer 2012 and evaluated by VNT. Data are expressed as median (min-max) \log_2 efficient dilution leading to 50% neutralisation of the challenge virus (ED50) and summarized by a box and whisker plot (the central line in the box plot indicates the median of the data, while the edges of the box indicate the 25th and 75th percentiles; extending from the box are whiskers, the top whisker expands to the 90th percentile and the bottom whisker to the 10th percentile; beyond the whiskers are observations that are relatively far from the median). *a, b and c differ significantly ($P < 0.05$)*

Fig.4 Evolution of anti-SBV antibody titers over years among ewes that underwent SBV emergence in late 2011 and SBV novel episode during summer 2012 and evaluated by VNT. Data are expressed as median (min-max) \log_2 efficient dilution leading to 50% neutralisation of the challenge virus (ED50) and summarized by a box and whisker plot (the central line in the box plot indicates the median of the data, while the edges of the box indicate the 25th and 75th percentiles; extending from the box are whiskers, the top whisker expands to the 90th percentile and the bottom whisker to the 10th percentile; beyond the whiskers are observations that are relatively far from the median). *a, b and c differ significantly ($P < 0.05$)*

Figure 5

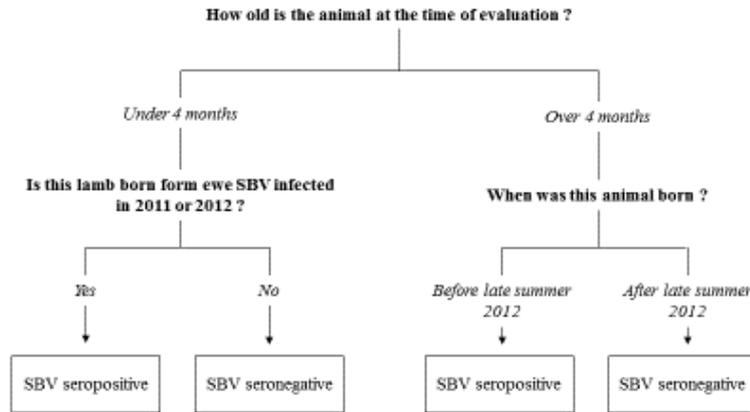


Fig. 5 Decision tree used when modelling SBV seroprevalence evolution in a sheep flock that encountered two episodes of natural infection considering the duration of colostral protection in lambs and active immunity in adults.

Fig. 5 Decision tree used when modelling SBV seroprevalence evolution in a sheep flock that encountered two episodes of natural infection considering the duration of colostral protection in lambs and active immunity in adults.

Figure 6a

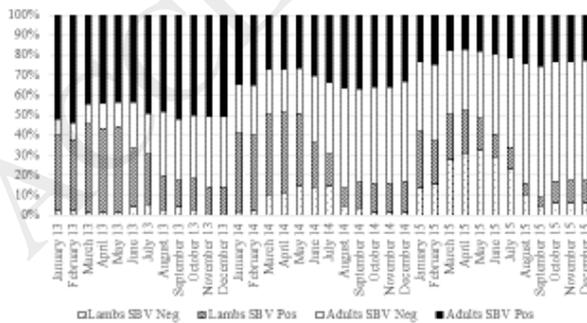


Figure 6b

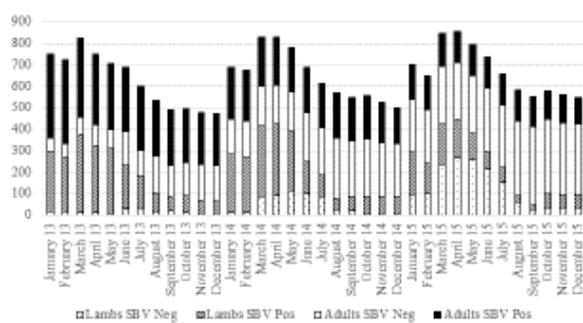


Fig. 6a-b Modelled evolution of SBV seropositive and seronegative animals expressed as percentages (6a) or absolute numbers (6b) from January 2013 until December 2015 in a sheep flock that encountered two natural SBV infections in 2011 and 2012 by considering the entire sheep flock (adults and all lambs produced).

Fig. 6a-b Modelled evolution of SBV seropositive and seronegative animals expressed as percentages (**6a**) or absolute numbers (**6b**) from January 2013 until December 2015 in a sheep flock that encountered two natural SBV infections in 2011 and 2012 by considering the entire sheep flock (adults and all lambs produced).

Figure 7

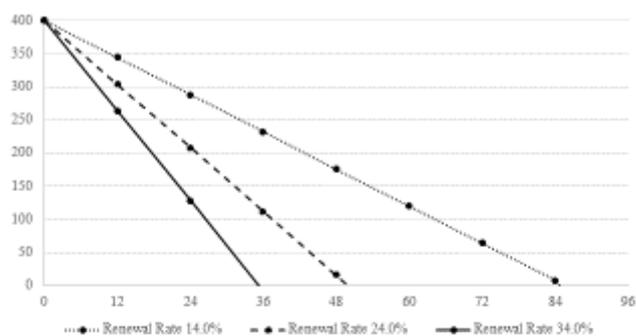


Fig. 7 Modelled evolution of SBV seropositive animals in a sheep flock over years related to the value of renewal rate applied (from 24.0% to 34.0%).

Fig. 7 Modelled evolution of SBV seropositive animals in a sheep flock over years related to the value of renewal rate applied (from 24.0% to 34.0%).

Table no 1

Animals (n =)	Expected serological status	VNT Result
185	positive	positive
6	negative	positive
356	negative	negative
0	positive	negative