

IX. Streszczenie

Wirus Schmallenberg (SBV) został wyizolowany w Europie jesienią 2011 roku, jako nowy, nieznany patogen należący do rodzaju *Orthobunyavirus*, rodziny *Peribunyaviridae*. Jest to arbowirus przenoszony przez owady krwiopijne, kuczmany (*Culicoides* spp.) i wywołujący łagodne zachorowania dorosłych przeżuwaczy, a przenoszony drogą pionową, poronienia lub zaburzenia morfogenezy płodów. W Polsce pierwsze przypadki zanotowano w 2012 roku u przeżuwaczy gospodarskich, jak również wolno żyjących oraz w wektorze. Celem prezentowanej pracy doktorskiej było określenie rozprzestrzenienia zakażeń SBV w ciągu pierwszych siedmiu lat trwania epizootyki w Polsce.

Oceniono przydatność komercyjnych testów ELISA do wykrywania przeciwciał u przeżuwaczy wolno żyjących i gospodarskich w odniesieniu do testu seroneutralizacji wirusa. Podczas przeprowadzonego doświadczalnego zakażenia bydła polskim szczepem SBV poddano ocenie dostępne ELISA i test seroneutralizacji pod kątem wykrywania wczesnych i późnych infekcji.

Początkowo badania obejmowały populacyjne badanie serologiczne (komercyjny test ELISA) przeżuwaczy gospodarskich. W latach 2013-2018 przebadano ponad 21,5 tysiąca próbek pobranych od bydła, owiec i kóz uzyskując seroprewalencję na poziomie odpowiednio 47%, 22% i 20%. Województwa zlokalizowane w centralnej i wschodniej Polsce cechowały się niższą seroprewalencją, a nadgraniczne województwa w południowej oraz północnej części kraju, najwyższą. W latach 2014 oraz 2017 zaobserwowano istotny wzrost odsetka seroreagentów.

Kolejnym etapem prac było badanie serologiczne (komercyjny test ELISA oraz opracowany test seroneutralizacji wirusa) oraz wirusologiczne (rt-RT-PCR obecności wirusa we krwi, osoczu oraz tkankach płodów) wybranych populacji zwierząt nieudomowionych w celu oceny ich roli, jako potencjalnego rezerwuaru wirusa dla przeżuwaczy gospodarskich. Próbkę pobrano w latach 2011-2016 od 347 żubrów, 203 dzików oraz 85 jeleniowatych (jeleni, sarna, łoś) z populacji wolno żyjących i hodowlanych. Na uwagę zasługuje odmienny odsetek seropozytywnych zwierząt różnych gatunków. Najwyższy odsetek, znacznie przewyższający ten stwierdzany dla przeżuwaczy gospodarskich, występował w populacji żubrów - 81%, podczas gdy jeleniowate wykazywały seroprewalencję na poziomie 34%. Dzikie natomiast wydają się być nie podatne na zakażenie (1%). W pierwszym sezonie epizootyki zwierzęta wolno żyjące mogły stanowić ważny rezerwuar wirusa w środowisku, jednak w kolejnych sezonach ich rola spadała.

Badania entomologiczne wektora odławianego w środowisku zwierząt gospodarskich (lata 2013-2017) oraz nieudomowionych (2014-2015) pozwoliły na określenie składu gatunkowego, porównanie liczebności oraz określenie długości sezonu aktywności kuczmanów w odmiennych biotopach. Jest to istotne, ponieważ jak wykazały przeprowadzone analizy, biologia wektora bezpośrednio determinuje narażenie zwierząt na zakażenie. Odłowów dokonywano za pomocą pułapek świetlnych UV. Badanie wirusologiczne (rt-RT-PCR) wykazało obecność materiału genetycznego wirusa w ok. 1% pul kuczmanów odławianych w środowisku sylwatyicznym, jaki również synantropijnym. Współczynnik zagęszczenia zakażonych owadów (DIM z ang. Density of Infected Midges) w latach 2013-2017 w środowisku zwierząt gospodarskich wynosił 0,53 na 1000 osobników. Przeprowadzone analizy wyników pozwoliły na wykrycie ognisk chorobowych w 2016 r. ze współczynnikiem DIM na poziomie 65. Uzyskane wyniki potwierdziły skuteczność badań wirusologicznych w wektorze, jako cennego narzędzia do przewidywania dynamiki zakażeń SBV. Określono

potencjał wektorowy poszczególnych gatunków wyłaniając *Culicoides obsoletus/scoticus* kompleks oraz *C. punctatus*, jako główne wektory SBV w Polsce; natomiast gatunek *C. pulicaris* zdaje się mieć marginalną rolę. Unikalne badania wszystkich stadiów cyklu gonotroficznego oraz samców kuczmanów ujawniły SBV- dodatnie pule owadów wśród samic przed pobraniem krwi (nulliparous) oraz samców. Może to stanowić pośredni dowód na istnienie, jak dotąd, niepotwierdzonej eksperymentalnie pionowej drogi szerzenia zakażenia SBV w populacji wektora.

Analiza wyników badań serologicznych przeżuwaczy oraz wirusologicznych populacji wektora pozwoliła zaobserwować zmianę charakteru występowania jednostki chorobowej z epidemicznego na endemiczny oraz obecność cyklicznych fal wzrostu odsetka zakażeń co około 2-4 lata. W połączeniu z badaniami entomologicznymi umożliwiło to nakreślenie wytycznych do optymalizacji dalszego, postepidemicznego, monitoringu zakażeń SBV w Polsce. Zaleca się przeprowadzanie celowanego badania serologicznego jałówek w wieku od 6. do 12. miesięcy, po każdym sezonie aktywności kuczmanów (od listopada do kwietnia następnego roku) we wszystkich województwach. Równolegle rekomenduje się badania wirusologiczne kuczmanów odłowionych od maja do października w ograniczonej liczbie starannie wybranych lokalizacji, z możliwie dużą częstotliwością próbkobrania.

Aby ocenić potencjał epidemiologiczny dostępnego w kraju nasienia buhajów opracowano metodę izolacji materiału genetycznego SBV z komercyjnie dostępnych słomek oraz przeprowadzono badanie RT-PCR ponad 130 próbek pobranych w latach 2013-2015. Stwierdzono materiał genetyczny SBV w ok. 5% próbek. Zwraca to uwagę na obecność potencjalnego źródła zakażenia podczas inseminacji. Zakażenia powstałe tą drogą mogą doprowadzić do zaistnienia odległych czasowo oraz terytorialnie ognisk chorobowych.

Zsekwencjonowano wirusowe RNA SBV z dodatniego materiału pochodzącego z pierwszych ognisk w Polsce, nasienia buhajów oraz pul kuczmanów, następnie przeprowadzono analizę filogenetyczną. Analiza polskich oraz europejskich sekwencji izolowanych od przeżuwaczy potwierdziła wysoką stabilność genetyczną segmentów S oraz L. Segment M kodujący glikoproteinę C był najbardziej zmienny. Uzyskano unikalne sekwencje pochodzące z materiału wyizolowanego z próbek kuczmanów. Analiza sekwencji sugeruje, iż w organizmach owadów wirus jest bardziej konserwatywny niż w gospodarzu ssaczym. Ponadto mutacje punktowe w izolatach owadziech były odmienne od mutacji w izolatach ssaczycy, występowały w innych miejscach genomu, głównie w genie kodującym niestrukturalne białko S.

Przeprowadzone badania stanowią zbiór unikalnych wyników pozwalających na wyciągnięcie wniosków dotyczących rozprzestrzenienia i charakterystyki nowego patogenu. Podkreślają konieczność holistycznego podejścia do badania arbowirusów zarówno w populacji ssaczego gospodarza jak również owadziego wektora; umożliwia to wyciągnięcie spójnych wniosków dotyczących dynamiki zakażeń. Przeprowadzone analizy łączą i porównują wyniki krajowe na tle ogólnoświatowych; mają również potencjał aplikacyjny - pozwoliły na nakreślenie wytycznych monitoringu SBV w fazie postepidemicznej w Polsce. Pomimo domniemanego, ograniczonego gospodarczo znaczenia zakażeń SBV należy podkreślić konieczność dalszego monitoringu wirusa w kraju. Ze względu na nawrotowe, cykliczne nasilone krążenie wirusa w środowisku można w przyszłości oczekiwać ponownej fali poronień i zmian wrodzonych u noworodków zwierząt gospodarskich.

X. Summary

Schmallenberg virus (SBV; *Orthobunyavirus* genus, *Peribunyaviridae* family) emerged in Europe in 2011. This novel arbovirus is transmitted by blood-feeding *Culicoides* midges and affects farm as well as free living ruminants. In adults, mild symptoms occur, while congenital disease leads to abortions and foetus deformities. In Poland, first cases were reported in 2012 in ruminants and midges. The main objective of presented dissertation was to evaluate distribution of SBV in host and vector during the first seven years of epizooty.

Usefulness of commercial ELISA tests, in respect to seroneutralisation was evaluated using farm and free-living ruminant serum. During experimental cattle inoculation with Polish SBV strain serological tests were assessed for early and late antibody detection.

Initially, over 21.5 thousand farm ruminants sampled between 2013 and 2018 were tested (commercial ELISA test). Seroprevalence was 47%, 22% and 20% in cattle, ewe and goat, respectively. In general, the greatest seroprevalence was observed in bordering south and northern provinces the lowest percentages in central and eastern provinces. In 2014 and 2017, an increase in seropositive animals percentage was observed.

Next step was serological (commercial ELISA, developed seroneutralisation test) and virological (rt-RT-PCR of blood serum and foetal tissue) testing of selected populations of free-living animals, to assess sylvatic virus reservoir. Samples were collected between 2011 and 2016 from both free-ranging and captive European bison, wild boar and cervids (respectively 347, 203 and 85 heads). Interestingly, results had shown different percentage of seropositive animals in different species. European bison's seroprevalence was the greatest (81%) surpassing those observed in farm ruminants. Approximately one third cervids had seroconverted, while only 1% wild boar with anti-SBV antibodies suggest insusceptibility to the infection. In the first epizooty season, wild animals may have been SBV reservoir for farmstock, while their role decreased in the following seasons.

Entomological studies of the virus vector in farmstock (2013-2017) and free-living animals (2014-2015) environment gave information about different species composition and abundance as well as differentiate midge activity season. Those information are crucial due to the fact that vector biology determine host animal exposure to infection. Insects were sampled using UV light traps. Virological testing (rt-RT-PCR) resulted in 1% positive pooled samples in both environments. Density of infected midges (DIM) in farmyard for all study years was 0,53 per 1000 midges. Data elaborations revealed disease outbreaks in 2016 with DIM reaching 65. Results confirmed midge vector surveillance as a valuable tool in predicting SBV dynamic. The vector potential of individual species was determined, revealing *Culicoides obsoletus/scoticus* complex and *C. punctatus* as the main SBV vectors in Poland, while *C. pulicaris* seems to have a marginal role. Unique studies of all stages of the gonotrophic cycle as well as male midges have demonstrated SBV RNA-positive pools from nulliparous ('virgin' insects before blood-feeding) as well as in males. This may provide indirect evidence for the existence of, a hitherto unconfirmed experimentally, vertical route of spreading SBV infection in the vector population.

The analysis of the obtained serological and virological results in ruminants revealed change in disease characteristic from epidemic to endemic with two to four years cyclic waves of increased the virus circulation Together with entomological studies the guidelines for the optimization of further, post-epidemic monitoring of SBV infections in Poland were implemented. It is recommended to carry out a targeted serological test of heifers aged 6 to 12 months, after each midge activity season (from November to April of the following

year) in all provinces. In parallel, virological test of the midges caught from May to October in a limited number of carefully selected locations, with the highest possible sampling frequency, is suggested.

To evaluate epidemiological status of commercially available bull semen straws, isolation method was elaborated and RT-PCR was implemented on over 130 samples collected between 2013 and 2015. The virus genetic material was found in app. 5% straws. Potentially infectious semen may lead to territorially and timely distant outbreaks, thus SBV testing of bull semen may be required.

Viral RNA was sequenced (Sanger's method, NGS and cloning in *E. coli* vector) from SBV-positive material from the first outbreaks in Poland, bull sperm and midges pools, subsequently phylogenetic analysis was performed. The analysis of Polish together with European sequences isolated from ruminants confirmed the high genetic stability of the S and L segments; while the M segment containing the genetic variable domain of glycoprotein C (HVR) was the most variable. Unique sequences were obtained from the material isolated from midge pools. These sequences suggest that the virus appears to be more conserved in insect organisms than in the mammalian host; moreover, the point mutations found in vector isolates were different from mutations in mammalian isolates and occurred elsewhere in the genome - mainly in the non-structural protein S.

The conducted research drew a collection of unique results and conclusions on the spread and characteristics of this new pathogen in the country. It emphasize the need for a holistic approach to the study of arboviruses in both the mammalian host population and the insect vector in order to draw consistent conclusions about the dynamics of infections. The conducted analysis combined and compared the national results against the global background; it also have application potential - allowed to define the guidelines for SBV monitoring in the post-epidemic phase in Poland. Despite the presumed limited economic importance of SBV infections, the need for further monitoring of the virus in the country should be emphasized. Due to the recurrent, cyclical increase in viral circulation in the environment, the wave of miscarriages and congenital changes in newborns of farm animals can be expected in the future.