

Streszczenie

Rozprawa doktorska obejmuje wykorzystanie metody sekwencjonowania nowej generacji (NGS) do wykrywania patogenów, w tym również tych nowych (z ang. *emerging*), których potencjalnymi wektorami lub rezerwuarem są muchówki z rodziny kuczmanowatych (*Ceratopogonidae*) rodzaju *Culicoides* spp. Materiał badawczy obejmował owady odłowione w pobliżu obór oraz w środowisku leśnym, które poddawane były badaniu entomologicznemu i pulowane w zależności od gatunku i formy gonotroficznej (*blood-fed*, w których odwłoku znajduje się niestrawiona krew; *nulliparous*, zwane także dziewiczymi, które jeszcze nie pobrały krwi; *parous*, zwane pigmentowanymi, które pobierały już krew i składały jaja co najmniej raz; oraz *gravid*, wypełnione pokładami jaj). Badano formy gonotroficzne w celu wyjaśnienia roli tych owadów w przenoszeniu patogenów tj. wektory biologiczne (wszystkie formy gonotroficzne) i mechaniczne (*blood-fed*). Badania koncentrowały się na drobnoustrojach zarówno środowiska synantropijnego, jak i sylwatyicznego, którego przedstawicielem był leśny gatunek *C. achrayi*. Ponieważ *Culicoides* spp. żerują na różnych gatunkach zwierząt spodziewano się szerokiej gamy mikroorganizmów, w tym niektórych specyficznych dla owadów, które stanowią o tzw. kontaminacji środowiska (z ang. *environmental contamination*). Brakuje danych dotyczących roli owadów krwio pijnych z rodzaju *Culicoides* spp. w przenoszeniu patogenów i ich specyficznej flory. Dotyczy to zwłaszcza Europy centralnej i wschodniej, gdzie zainteresowanie tymi owadami jest dość nowe, związane z pojawieniem się dotąd uważanych za egzotyczne w naszej szerokości geograficznej (z ang. *re-emerging*) wirusów BTV i wirus Schmallenberg (SBV). *Culicoides* spp. są również potwierdzonymi wektorami innych wirusów o istotnym znaczeniu gospodarczym, takich jak wirus afrykańskiego pomoru koni (AHSV) i wirus choroby krwotocznej zwierzyny płowej (EHDV). Ponadto mogą się one przyczyniać do rozprzestrzeniania innych patogenów wirusowych, bakteryjnych oraz pierwotniaczych atakujących ssaki, ptaki jak również ludzi. Zastosowanie sekwencjonowania nowej generacji u stawonogów może znacznie wzbogacić nasze rozumienie różnorodności biologicznej mikroflory stawonogów. Monitorowanie patogenów krążących w wektorach owadach może być też ważną strategią zapobiegania epidemiom i umożliwia stały nadzór ich wczesnego wykrywania. Prace objęły optymalizację niektórych metod przygotowawczych do dalszych analiz NGS i analizy danych. Przeprowadzone badania stanowią pilotaż całkiem nowego, interdyscyplinarnego podejścia do badania patogenów przenoszonych przez stawonogi i biologii wektorowej i mogą być stosowane w dalszych badaniach, zapobieganiu i kontroli 8

znanych i nowych wirusów. Badania metagenomiczne potwierdziły występowanie bogatego i złożonego mikrobiomu/wiromu u *Culicoides* spp. Zidentyfikowano skład wiromu przenoszony przez *Culicoides obsoletus/scoticus* complex, *C. punctatus* i *C. achrayi*. Za pomocą analizy NGS stwierdzono występowanie homologicznych sekwencji do genomu bakterii endosymbiotycznych (*Candidatus Cardinium*, *Rickettsia*, *Rickettsiella* oraz *Asaia*), bakterii chorobotwórczych (*Rickettsia*, *Yersinia*) i wewnątrzkomórkowych (*Chlamydiae*) oraz wirusów (*Lentivirus*, *Mimivirus*, *Enterovirus*, *Alphainfluenzavirus*, *Cornellvirus*, *Rotavirus*, *Rogunavirus*, *Hepacivirus*, *Certrevirus*, *Asterivirus*), grzybów (*Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Talaromyces*, *Exophiala*, *Schizosaccharomyces*, *Leptosphaeria*, *Blumeria*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*), protista (*Plasmodium*, *Tetrahymena*, *Trypanosoma*, *Dictyostelium*, *Paramecium*, *Leishmania*, *Entamoeba*, *Babesia*, *Eimeria*, *Trichomonas*) i archeonów (*Methanosarcina*, *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanococcus*, *Nitrosopumilus*, *Acidianus*, *Methanocaldococcus*). W przeprowadzonej analizie metagenomicznej wykryto duży udział wirusów, które zostały oznaczone jako niesklasyfikowane. Skład społeczności drobnoustrojów był różny u różnych gatunków *Culicoides* spp. Większe zróżnicowanie mikrobiomu występowało u *Culicoides*

obsoletus/scoticus complex, a najmniejsze u *C. achrayi*. Zbadano różnice w mikrobiomie/wiromie różnych form gonotroficznych *Culicoides* spp. (*blood-fed/parous/nulliparous/gravid*) a także płci: największa różnorodność mikroorganizmów występuje u *C. obsoletus blood-fed* a najmniejsza u *parous*, co sugeruje możliwość transmisji mechanicznej szerokiej gamy patogenów poprzez żerowanie na krwi różnych zwierząt. Wiromy i mikrobiomy różnych gatunków *Culicoides* spp. są różne, co może sugerować różnice w kompetencjach nosicieli/wektorów.