

Załącznik nr 2 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

dr n. wet. Katarzyna Dudek

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

Zakład Chorób Bydła i Owiec

A U T O R E F E R A T

Puławy 2019

1. Imię i Nazwisko.

Katarzyna Dudek

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Stopień naukowy doktora nauk weterynaryjnych – 2007 r.; specjalność: fizjologia zwierząt; Akademia Rolnicza w Lublinie (aktualnie Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie), Wydział Medycyny Weterynaryjnej; tytuł rozprawy doktorskiej: „Wpływ lipopolisacharydu na wystąpienie i przebieg gorączki, kształtowanie się tolerancji pirogenowej oraz wskaźniki immunologiczne i zapalne u gołębi”

Tytuł lekarza weterynarii – 2003 r.; Akademia Rolnicza w Lublinie (aktualnie Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie), Wydział Medycyny Weterynaryjnej

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

Od 2008 r. – adiunkt; Zakład Chorób Bydła i Owiec, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy (PIWet-PIB) w Puławach

2007 – 2008 r. – główny specjalista badawczo-techniczny; Zakład Chorób Bydła i Owiec, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

2006 – 2007 r. – specjalista inżynierjno – techniczny – lekarz weterynarii; Zakład Chorób Bydła i Owiec, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

2003 – 2007 r. – uczestnik Studiów Doktoranckich; Akademia Rolnicza w Lublinie (aktualnie Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie), Wydział Medycyny Weterynaryjnej; Katedra Biochemii i Fizjologii Zwierząt; Zakład Fizjologii Zwierząt (aktualnie Katedra Fizjologii Zwierząt)

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

„Badania nad mechanizmami komórkowej i humoralnej odporności u cieląt w przebiegu zakażeń *Mycoplasma bovis* oraz próby ich kontroli za pośrednictwem eksperymentalnej szczepionki”.

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)

H-1: Bednarek D., Ayling R.D., Nicholas R.A.J., **Dudek K.**, Szymańska-Czerwińska M.: Serological survey to determine the occurrence of respiratory *Mycoplasma* infections in the Polish cattle population. *Veterinary Record* 2012, 171, 45.

IF₂₀₁₂ = **1,803**; MNiSW₂₀₁₂ = **30 pkt**; liczba cytowań (Web of Science Core Collection) – **13**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, kolekcji prób do badań, wykonaniu części badań laboratoryjnych, interpretacji wyników, przygotowaniu pracy do druku oraz jej korekcie po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 50 %

H-2: Dudek K., Bednarek D.: Last survey of *Mycoplasma bovis* prevalence in Polish cattle affected with respiratory syndrome. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2012, 56, 447-451.

IF₂₀₁₂ = **0,377**; MNiSW₂₀₁₂ = **20 pkt**; liczba cytowań (Web of Science Core Collection) – **10**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, kolekcji prób do badań, wykonaniu części badań laboratoryjnych, interpretacji wyników, przygotowaniu pracy do druku oraz jej korekcie po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 80 %

H-3: Dudek K., Bednarek D., Szacawa E.: Stimulating effect of *Mycoplasma bovis* infection on proinflammatory response in infected cattle. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2011, 55, 599-602.

IF₂₀₁₁ = **0,414**; MNiSW₂₀₁₁ = **20 pkt**; liczba cytowań (Web of Science Core Collection) – **3**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badań laboratoryjnych, interpretacji wyników, przygotowaniu pracy do druku oraz jej korekcie po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 80 %

Nagroda III-stopnia Dyrektora PIWet-PIB w konkursie na najlepszą publikację pracowników naukowych PIWet-PIB w Puławach w roku 2011 za cykl prac.

H-4: Dudek K., Bednarek D., Szacawa E.: Evaluation of immune response in seropositive cattle for *Mycoplasma bovis*. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2011, 55, 631-634.

IF₂₀₁₁ = **0,414**; MNiSW₂₀₁₁ = **20 pkt**; liczba cytowań (Web of Science Core Collection) – **8**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badań laboratoryjnych, interpretacji wyników, przygotowaniu pracy do druku oraz jej korekcie po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 80 %

Nagroda III-stopnia Dyrektora PIWet-PIB w konkursie na najlepszą publikację pracowników naukowych PIWet-PIB w Puławach w roku 2011 za cykl prac.

H-5: Dudek K., Bednarek D., Ayling R.D., Szacawa E.: Immunomodulatory effect of *Mycoplasma bovis* in experimentally infected calves. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2013, 57, 499-506.

IF₂₀₁₃ = **0,365**; MNiSW₂₀₁₃ = **20 pkt**; liczba cytowań (Web of Science Core Collection) – **7**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu eksperymentu na zwierzętach, wykonaniu części badań laboratoryjnych, interpretacji wyników, przygotowaniu pracy do druku oraz jej korekcie po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 70 %

H-6: Dudek K., Bednarek D., Szacawa E., Rosales R.S., Ayling R.D.: Flow cytometry follow-up analysis of peripheral blood leukocyte subpopulations in calves experimentally infected with field isolates of *Mycoplasma bovis*. Acta Veterinaria Hungarica 2015, 63, 167-178.

IF₂₀₁₅ = **0,871**; MNiSW₂₀₁₅ = **20 pkt**; liczba cytowań (Web of Science Core Collection) – **5**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu eksperymentu na zwierzętach, wykonaniu części badań

laboratoryjnych, interpretacji wyników, przygotowaniu pracy do druku oraz jej korekcie po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 70 %

H-7: Dudek K., Bednarek D., Ayling R.D., Szczotka M., Iwan E., Kocki J.: Analysis of the immune response of calves to various saponin-based adjuvants for an experimental *Mycoplasma bovis* vaccine. *Acta Veterinaria Hungarica* 2018, 66, 226-240.

IF₂₀₁₇ = **1,042**; MNiSW₂₀₁₇ = **25 pkt**; liczba cytowań (Web of Science Core Collection) – **1**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu eksperymentu na zwierzętach, wykonaniu części badań laboratoryjnych, interpretacji wyników, przygotowaniu pracy do druku oraz jej korekcie po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 70 %

H-8: Dudek K., Bednarek D.: T- and B-cell response analysis following calf immunisation with experimental *Mycoplasma bovis* vaccine containing saponin and lysozyme dimer. *Journal of Veterinary Research* 2017, 61, 433-437.

IF₂₀₁₇ = **0,811**; MNiSW₂₀₁₆ = **15 pkt**; liczba cytowań (Web of Science Core Collection) – **1**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu eksperymentu na zwierzętach, wykonaniu części badań laboratoryjnych, interpretacji wyników, przygotowaniu pracy do druku oraz jej korekcie po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 90 %

H-9: Dudek K., Bednarek D.: Saponin-based *Mycoplasma bovis* vaccine containing lysozyme dimer adjuvant stimulates acute phase response in calves. *Journal of Veterinary Research* 2018, 62, 269-273.

IF₂₀₁₇ = **0,811**; MNiSW₂₀₁₇ = **20 pkt**; liczba cytowań (Web of Science Core Collection) – **0**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu eksperymentu na zwierzętach, wykonaniu części badań laboratoryjnych, interpretacji wyników, przygotowaniu pracy do druku oraz jej korekcie po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 90 %

H-10: Dudek K., Bednarek D., Ayling R.D., Kycko A., Szacawa E., Karpińska T.A.: An experimental vaccine composed of two adjuvants gives protection against *Mycoplasma bovis* in calves. *Vaccine* 2016, 34, 3051-3058.

IF₂₀₁₆ = **3,235**; MNiSW₂₀₁₆ = **30 pkt**; liczba cytowań (Web of Science Core Collection) – **14**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu eksperymentu na zwierzętach, wykonaniu części badań laboratoryjnych, interpretacji wyników, przygotowaniu pracy do druku oraz jej korekcie po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 70 %

- ❖ Sumaryczna wartość współczynnika wpływu (Impact Factor, IF) dla publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe według Web of Science Core Collection – **10,143**.
- ❖ Sumaryczna liczba punktów MNiSW dla publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe – **220 pkt**.
- ❖ Sumaryczna liczba cytowań według Web of Science Core Collection dla publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe – **62**.

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Zakażenia mykoplazmowe stanowią poważny problem zdrowotny i ekonomiczny w hodowli bydła w kraju i na świecie. Mykoplazmy należą do drobnoustrojów, które łączą w sobie cechy wirusów i bakterii właściwych. Charakteryzują się brakiem ściany komórkowej, której miejsce zastąpiła trójwarstwowa błona cytoplazmatyczna (Baum 2005). Jedną z najczęściej izolowanych obecnie mykoplazm z przypadków chorobowych u bydła jest *Mycoplasma bovis*, która wywołuje stany zapalne w obrębie płuc, oskrzeli, gruczołu mlekowego, układu rozrodczego, stawów, narządu słuchu i wzroku, a nawet opon mózgowo-rdzeniowych i serca (Alberti i wsp. 2006; Maeda i wsp. 2003; Nicholas i Ayling 2003; Puleio i wsp. 2017). *M. bovis* odgrywa również ważną rolę w etiologii syndromu oddechowego bydła (bovine respiratory disease, BRD), którego wieloczynnikowy charakter warunkują obok czynników środowiskowych drobnoustroje z rodziny *Pasteurellaceae*, a także wirusy układu oddechowego bydła (Arcangioli i wsp. 2008; Welsh i wsp. 2004; Xue i wsp. 2010). Warto podkreślić, że *M. bovis* wchodzi w interakcje z innymi drobnoustrojami odpowiedzialnymi za BRD, np. jej obecność w obrębie płuc może zwiększać zjadliwość i chorobotwórczość *Mannheimia haemolytica* (Houghton i Gourlay 1983). *M. bovis* należy do polimorficznych drobnoustrojów, co warunkowane jest obecnością na powierzchni błony komórkowej tej bakterii zmiennych białek powierzchniowych

(variable surface proteins, Vsp) (Caswell i wsp. 2010). Dzięki obecności Vsp *M. bovis* wykazuje również zdolność do interakcji z komórkami gospodarza (Nicholas i Ayling 2003; Razin 1992). Białka te odpowiadają także w dużej mierze za produkcję tzw. biofilmu, czyli skupisk komórek, które w porównaniu z komórkami planktonicznymi wykazują dużo wyższą oporność, bo aż do 1000 razy, na działanie antybiotyków, przeciwciał czy komórek fagocytyujących, jak również na wpływ niekorzystnych dla wzrostu i rozwoju tych drobnoustrojów czynników środowiskowych (Caswell i wsp. 2010; Mah i O'Toole 2001; McAuliffe i wsp. 2006; Nicholas i wsp. 2017). *M. bovis* posiada niewielką masę cząsteczkową genomu oraz niski stosunek dwóch zasad azotowych nukleotydów, tj. cytozyny do guaniny. Do najważniejszych cech biochemicznych *M. bovis* należy brak zdolności do fermentacji glukozy i hydrolizy argininy (Nicholas i Ayling 2003). Zakażenia na tle *M. bovis* występują nie tylko w Europie, ale także na kontynencie Ameryki Północnej i Azji, a ostatnie doniesienia wskazują na obecność tego drobnoustroju także w Australii i Nowej Zelandii (Nicholas i Ayling 2003, Qi i wsp. 2012; Wawegama i wsp. 2016). *M. bovis* posiada właściwości immunomodulujące. Z jednej strony bakteria ta stymuluje odpowiedź ostrej fazy, która odpowiedzialna jest za przywrócenie zaburzonej homeostazy organizmu gospodarza, z drugiej zaś wpływa immunosupresyjnie, upośledzając np. proliferację limfocytów oraz indukując ich apoptozę (Vanden Bush i Rosenbusch 2002, 2004). Zwalczenie zakażeń *M. bovis* jest trudne z uwagi na długotrwałe siewstwo tej bakterii, które odbywać się może zarówno drogą bezpośrednią, jak i pośrednią. Do bezpośrednich dróg szerzenia się zakażenia *M. bovis* w stadzie należy droga horyzontalna (np. nasienie) oraz wertykalna, z matki na potomstwo (zakażenie śródmaciczne). Z kolei z dróg pośrednich należy wymienić drogę kontaktową (np. wydaliny dróg moczowych), aerogenną, czy też pokarmową (siara, mleko). Natomiast w obrębie tego samego osobnika *M. bovis* rozprzestrzenia się drogą hematogenną, dlatego często diagnozowane jest współistnienie zakażenia tą mykoplazmą na poziomie różnych układów, np. płuc i stawów (Nicholas i Ayling 2003). Przez długie lata *M. bovis* uważana była za zewnątrzkomórkowy organizm, dopiero stosunkowo niedawno wykazano zdolność do przenikania tej bakterii do wnętrza komórek fagocytyujących i nie fagocytyujących (Bürki i wsp. 2015; Kleinschmidt i wsp. 2013; Maeda i wsp. 2003; van der Merwe i wsp., 2010). Wewnątrzkomórkowy charakter bakterii umożliwia zatem jej przeżycie w organizmie gospodarza, co sprzyja niejednokrotnie występowaniu bezobjawowego nosicielstwa w stadzie. Warto wspomnieć, że zakażenia *M. bovis* dotyczą nie tylko

wszystkich grup wiekowych bydła, ale również zróżnicowanych grup technologicznych tego gatunku zwierząt (Giovannini i wsp. 2013; Nicholas i Ayling, 2003). Trudności w zwalczaniu zakażeń *M. bovis* stwarza dodatkowo obserwowana w ostatnim czasie narastająca w Europie oporność terenowych szczepów tej bakterii na antybiotyki stosowane rutynowo w leczeniu zwierząt, zwłaszcza w odniesieniu do makrolidów i tetracyklin (Ayling i wsp. 2014; Gautier-Bouchardon i wsp. 2014; Sulyok i wsp. 2014). Z drugiej strony, jak dotychczas w Europie brak jest komercyjnych szczepionek przeciwko zakażeniom *M. bovis* u bydła. Szczepionki te są dostępne jedynie na terenie Stanów Zjednoczonych, ale ich skuteczność nie została jak na razie w pełni udowodniona (Soehnlén i wsp. 2011). Opracowanie szczepionki podjednostkowej pomimo pewnej stymulacji odporności humoralnej, nie chroniło także w pełni przed zakażeniem *M. bovis* (Mulongo i wsp. 2013). Bardziej obiecujące efekty uzyskano natomiast dzięki zastosowaniu szczepionki żywej, jednak wraz z osłabieniem zjadliwości bakterii obniżała się jej skuteczność (Zhang i wsp. 2014). W tym przypadku nie można także wykluczyć ryzyka rewersji szczepu szczepionkowego do formy zjadliwej bakterii. Badania prowadzone nad opracowaniem inaktywowanej szczepionki przeciwko zakażeniom *M. bovis* z udziałem formaliny przynosiły pewne korzystne rezultaty, jednak końcowy efekt nie był w pełni zadowalający, a niekiedy obserwowano nawet pogorszenie stanu klinicznego zwierząt (Rosenbusch 1998). Przełomem w badaniach nad szczepionką inaktywowaną przeciwko zakażeniom *M. bovis* u bydła okazało się wykorzystanie saponiny, która spełniała dwojaką rolę, inaktywatora komórek mykoplazmowych i skutecznego immunostymulatora (adiuwantu). Zastosowanie eksperymentalnej szczepionki opartej na saponinie stymulowało odporność humoralną cieląt, poprawiało ich stan kliniczny oraz ograniczało rozwój zmian patologicznych w płucach w następstwie zakażenia *M. bovis* (Nicholas 2002). Szczepionka ta nie została jednak opracowana ostatecznie w formie komercyjnego preparatu.

Z uwagi na stały problem zakażeń *M. bovis* w krajowej populacji bydła, zwłaszcza w grupie cieląt i młodego bydła opasowego, zasadnym wydało się zatem podjęcie badań nad opracowaniem skutecznej szczepionki przeciwko tym zakażeniom, w oparciu o szczep *M. bovis* pochodzący z własnej kolekcji oraz odpowiednią kombinację adiuwantów.

W prezentowanym jednotematycznym cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe wyznaczono następujące cele:

1. Ocena sytuacji epizootycznej zakażeń *Mycoplasma bovis* w krajowej populacji bydła.
2. Ocena wpływu zakażeń *Mycoplasma bovis* na układ immunologiczny bydła.
3. Wybór szczepu *Mycoplasma bovis* wykazującego najlepsze właściwości w odniesieniu do badanych cech i potencjalnej jego przydatności do budowy szczepionki.
4. Wybór odpowiedniej kombinacji adiuwantów spełniających najlepsze właściwości w odniesieniu do badanych cech i potencjalnej ich przydatności do budowy szczepionki.
5. Opracowanie szczepionki i jej ocena w warunkach eksperymentalnych na cielętach.

Ad.1. Ocena sytuacji epizootycznej zakażeń *Mycoplasma bovis* w krajowej populacji bydła.

Problem zakażeń *M. bovis* w Europie sięga blisko 1/3 klinicznych przypadków zapaleń płuc u bydła (Nicholas i Ayling 2003). Badania serologiczne prowadzone w Szwajcarii wykazały odsetek zwierząt dodatnich na poziomie 50 %, podczas gdy w innych krajach europejskich wynosił on odpowiednio: Francja (10-20 %), Węgry (11 %), Wielka Brytania (22 %), a w Północnych Włoszech odsetek ten osiągał aż 88 %, z czego 76 % dotyczyło bydła dorosłego, natomiast 100 % - cieląt (Ayling i wsp. 2004; Le i wsp. 2002; Radaelli i wsp. 2008; Tenk i wsp. 2004; Tschopp i wsp. 2001).

Pierwsze badania nad oceną sytuacji epizootycznej zakażeń *Mycoplasma bovis* w populacji bydła w Polsce przeprowadzono w latach 2007-2010, co zostało opisane w publikacji (H-1: **Bednarek D., Ayling R.D., Nicholas R.A.J., Dudek K., Szymańska-Czerwińska M.: Serological survey to determine the occurrence of respiratory *Mycoplasma* infections in the Polish cattle population. Veterinary Record 2012, 171, 45**). Ocenie poddano 3670 surowic pochodzących z 361 stad bydła na terenie 16 województw naszego kraju. Badane próbki pochodziły od zwierząt o różnym statusie zdrowotnym: klinicznie zdrowych (2005 sztuk), od krów mlecznych wykazujących objawy kliniczne ze strony układu oddechowego (801 sztuk), jak

również od cieląt z objawami wskazującymi na syndrom oddechowy bydła (864 sztuki). Surowice przebadano w kierunku obecności specyficznych przeciwciał anti-*M. bovis* z wykorzystaniem komercyjnego testu immunoenzymatycznego (ELISA). Na podstawie oceny wszystkich województw wykazano blisko 77 % seroprewalencję zakażeń *M. bovis*. Najwyższy odsetek surowic dodatnich obserwowano w województwie wielkopolskim (88 %), z kolei najniższy - w województwie mazowieckim (59 %). Niższy odsetek wyników dodatnich zanotowano także w województwie śląskim (69 %). Wyniki uzyskane dla poszczególnych województw miały pewne przełożenie w analizie seroprewalencji zakażeń *M. bovis* na poziomie regionów, która wykazała najwyższy procent próbek dodatnich w regionie północno-zachodnim (ponad 84 %), podczas gdy południowy region charakteryzował się najniższym ich odsetkiem (powyżej 73 %). W wyniku przeprowadzonych badań wykazano również, że zakażenia *M. bovis* w Polsce mają charakter endemiczny z uwagi na obecność zwierząt serododatnich we wszystkich województwach oraz wysoki średni odsetek stad dodatnich rzędu 81 %. Odsetek ten był wyraźnie wyższy w grupie zwierząt chorych (87 %) w porównaniu do zwierząt klinicznie zdrowych (66 %).

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że zakażenia *M. bovis* w Polsce dotyczą różnych grup wiekowych bydła, a najwyższy odsetek surowic dodatnich notowano w północno-zachodnim regionie, który charakteryzuje się intensywną produkcją i hodowlą bydła. Po uwzględnieniu jednak sugestii producenta co do progu czułości zastosowanego testu ELISA i zmiany zasad interpretacji uzyskanych wyników na poziomie przyjętego obecnie „cut off”, ostateczna seroprewalencja zakażeń *M. bovis* w Polsce oceniana jest na poziomie wynoszącym około 30 % i jest ona zbliżona do tej notowanej w innych krajach europejskich.

Po uwzględnieniu w ostatecznej interpretacji uzyskanych wyników najwyższych wartości stopni pozytywności dla przeciwciał anti-*M. bovis* (wyłącznie zakres +++ i ++++) końcowa seroprewalencja tych zakażeń w Polsce oscyluje w granicach 30 % i jest ona zbliżona do tej notowanej w innych krajach europejskich.

Badania te były następnie kontynuowane w 2011 r., ograniczono się jednak w tym przypadku wyłącznie do oceny prewalencji zakażeń *M. bovis* u cieląt w przebiegu BRD, co przedstawia publikacja (**H-2: Dudek K., Bednarek D.: Last survey of *Mycoplasma bovis* prevalence in Polish cattle affected with respiratory syndrome. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2012, 56, 447-451**).

Ogółem przebadano 841 surowic oraz dodatkowo 41 próbek wymazów z jamy nosowo-gardłowej oraz wycinków płuc bydła. Próbki te pochodziły z 13 województw usytuowanych na terenie 5 regionów Polski. W obrębie poszczególnych regionów przebadano następującą liczbę próbek: region wschodni - 239 surowic (cztery województwa) oraz 11 wymazów z jamy nosowo-gardłowej (jedno województwo), region centralny - 146 surowic (dwa województwa), dwie próbki płuc (jedno województwo) oraz 22 wymazy z jamy nosowo-gardłowej (jedno województwo), region południowy - 140 surowic (dwa województwa), region północno-zachodni - 259 surowic (trzy województwa), cztery próbki płuc (jedno województwo) oraz dwa wymazy z jamy nosowo-gardłowej (jedno województwo), region północny - 23 surowice (jedno województwo) oraz region południowo-zachodni - 34 surowice pochodzące z jednego województwa. Otrzymane surowice przebadano w kierunku obecności specyficznych przeciwciał anty-*M. bovis*, z kolei z próbek wymazów oraz wycinków płuc izolowano antygen *M. bovis*. Do obydwu analiz wykorzystano komercyjne zestawy ELISA. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano ogólną seroprewalencję zakażeń *M. bovis* rzędu 64 %. Najwyższy odsetek surowic dodatnich zanotowano w województwie małopolskim (82 %), z kolei najniższą seroprewalencję obserwowano w województwie lubelskim, która kształtowała się na poziomie 43 %. Analiza seroprewalencji zakażeń *M. bovis* na poziomie regionów wykazała natomiast najwyższy odsetek surowic dodatnich w regionie wschodnim (72 %), podczas gdy region centralny wykazywał najniższą seroprewalencję rzędu 53 %. Zbliżony odsetek zwierząt dodatnich serologicznie jak dla regionu centralnego zanotowano dla regionu północnego (57 %). W pozostałych regionach odsetek ten kształtował się w przedziale 59-66 %. Z kolei w odniesieniu do wyników badań wymazów i wycinków płuc wykazano obecność tylko jednego izolatu *M. bovis*, który pochodził z wycinków płuc otrzymanych z województwa zachodniopomorskiego.

Wyniki badań wykazały, że problem zakażeń na tle *M. bovis* w populacji bydła w Polsce jest nadal aktualny, a seroprewalencja zakażeń tym drobnoustrojem nadal utrzymuje się na wysokim poziomie.

Ad.2. Ocena wpływu zakażeń *Mycoplasma bovis* na układ immunologiczny bydła.

Donosi się, że *M. bovis* należy do drobnoustrojów o zmiennej reaktywności immunologicznej, tj. posiada właściwości zarówno immunostymulujące, jak

i immunosupresyjne (Razin i wsp. 1998). Dotychczas wykazano, że bakteria ta jest zdolna do stymulacji produkcji niektórych cytokin, z drugiej zaś strony wpływa hamująco na funkcje komórek układu białokrwinkowego, np. wybuch tlenowy (Jungi i wsp. 1996; Thomas i wsp. 1991).

W procesie zapalnym z fosfolipidów błon komórkowych uwalniany jest kwas arachidonowy, z którego na drodze lipooksygenacji dochodzi do syntezy leukotrienów, tj. jednych z ważniejszych proimmunologicznych metabolitów tego kwasu. Procesem równoległym do lipooksygenacji jest natomiast cyklooksygenacja, w konsekwencji której syntetyzowane są prostanoidy: prostaglandyny, tromboksany i prostacykliny (Traczyk i Trzebski 2001).

W Polsce pierwsze badania nad oceną wpływu *M. bovis* na układ immunologiczny bydła wykonano na łącznej liczbie 75 zwierząt, spośród których 56 stanowiły cielęta, natomiast pozostałe 19 należało do osobników dorosłych, co opisano w publikacji (H-3: Dudek K., Bednarek D., Szacawa E.: **Stimulating effect of *Mycoplasma bovis* infection on proinflammatory response in infected cattle. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2011, 55, 599-602**). Od wszystkich zwierząt otrzymano surowicę, którą przebadano w kierunku obecności specyficznych przeciwciał anti-*M. bovis* z wykorzystaniem komercyjnego zestawu ELISA. Wyniki badań serologicznych wykazały obecność specyficznych przeciwciał u 75 % cieląt oraz 79 % osobników dorosłych, co w znacznym stopniu pokrywało się z wyraźnymi objawami klinicznymi zapalenia płuc u tych zwierząt. W kolejnym etapie w surowicy wszystkich badanych zwierząt określono stężenie prostanoidów (prostaglandyn PGE₂, PGF_{2α} i tromboksanów - TXB₂) oraz leukotrienów (LTB₄), jako dobrze poznanych wskaźników odpowiedzi zapalnej. Analizy przeprowadzono przy użyciu oddzielnych dla każdego z badanych parametrów komercyjnych zestawów ELISA. Wyniki badań wykazały statystycznie istotny wzrost stężenia PGF_{2α} i TXB₂ u cieląt serododatnich, z kolei u dorosłego bydła ze stwierdzoną obecnością specyficznych przeciwciał anti-*M. bovis* wykazano wyraźnie podwyższone stężenie PGE₂ i TXB₂. Istotny wzrost stężenia TXB₂ obserwowano u obydwu grup wiekowych bydła, tj. ponad 7-krotny u cieląt i 4-krotny u dorosłego bydła. Tromboksany należą do silnych aktywatorów agregacji trombocytów i czynników kurczących naczynia krwionośne (Bye i wsp. 1979), a także odpowiadają za przyleganie trombocytów do ścian naczyń krwionośnych. W konsekwencji u serododatnich zwierząt dochodzić mogło do powstania śródnaczyniowych zakrzepów w obrębie docelowych narządów

i tkanek. Z kolei stymulacja produkcji prostaglandyn u zwierząt z potwierdzoną obecnością przeciwciał anty-*M. bovis* prowadzić mogła do zwiększonego rozprzestrzeniania się bakterii w organizmie gospodarza wskutek rozszerzenia i wzrostu przepuszczalności naczyń krwionośnych (Krzymowski i Przała 2005).

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że wybrane prostanoidy spełniają rolę mediatorów odpowiedzi zapalnej u bydła z objawami zapalenia płuc na tle *M. bovis*.

Odpowiedź ostrej fazy (acute phase response, APR) jest składową niespecyficzną reakcją organizmu, tj. immunologiczną, behawioralną, metaboliczną i innymi w odpowiedzi na stan zapalny, infekcję lub uraz. Do jednych z najważniejszych komponentów APR należą białka ostrej fazy (acute phase proteins, APPs), których stężenie rośnie lub maleje w odpowiedzi na stan zapalny (Gruys i wsp., 1994; Stefaniak 2003). Do pierwszych z nich, tzw. pozytywnych APPs, zaliczamy u bydła np. surowiczy amyloid A (serum amyloid A, SAA) i haptoglobinę (haptoglobin, Hp). Z kolei negatywne APPs u tego gatunku zwierząt, których stężenie maleje w warunkach APR, to przykładowo albumina (Stefaniak 2003; Toussaint i wsp. 1995). Hp i SAA uważane są jak dotychczas za najbardziej indykatorowe APPs u bydła (Murata i wsp. 2004; Petersen i wsp. 2004). Wyraźną stymulację produkcji Hp i SAA w odpowiedzi na dotchawicową inokulację cieląt *M. bovis* obserwowano we wcześniejszych badaniach własnych (Dudek i wsp. 2010). W oparciu o te wyniki, jak również rezultaty opisane w publikacji **H3** podjęto próbę szczegółowej oceny wpływu *M. bovis* na układ immunologiczny bydła z potwierdzoną obecnością przeciwciał dla tego drobnoustroju. Wyniki tych badań przedstawia publikacja (**H-4: Dudek K., Bednarek D., Szacawa E.: Evaluation of immune response in seropositive cattle for *Mycoplasma bovis*. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2011, 55, 631-634**). Analizie poddano łącznie 160 zwierząt, do której należało 139 cieląt i 21 osobników dorosłych. Od wszystkich zwierząt pozyskano surowice, które początkowo przebadano w kierunku obecności specyficznych przeciwciał anty-*M. bovis* z wykorzystaniem komercyjnego zestawu ELISA. Wyniki badań serologicznych wykazały obecność specyficznych przeciwciał u 118 cieląt (85 %) oraz u 15 osobników dorosłych, co stanowiło 86 % tej grupy wiekowej bydła. W celu oceny wpływu *M. bovis* na odporność badanych zwierząt, w pozyskanej od nich surowicy określono stężenie wybranych parametrów immunologicznych, takich jak białko całkowite,

γ -globuliny oraz wybrane APPs, tj. Hp i SAA. U serododatnich cieląt wykazano statystycznie istotny wzrost stężenia wszystkich badanych parametrów, w tym prawie 3-krotny w odniesieniu do analizowanych APPs. Z kolei u dorosłego bydła, u którego potwierdzono obecność specyficznych przeciwciał anty-*M. bovis*, jedynie stężenie SAA było istotnie podwyższone w porównaniu do zwierząt serologicznie ujemnych.

Otrzymane wyniki potwierdziły wcześniejsze badania własne, gdzie obserwowano wyraźną stymulację produkcji białka całkowitego, γ -globulin, Hp i SAA w następstwie eksperymentalnego zakażenia cieląt *M. bovis* (Dudek i wsp. 2010). Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzono immunostymulujący charakter *M. bovis*, który przejawiał się aktywacją APR wyrażoną stymulacją produkcji ważnych jej komponentów, tj. APPs oraz wzmożoną odpornością humoralną u serododatnich zwierząt, co było widoczne zwłaszcza u młodych osobników.

Ad.3. Wybór szczepu *Mycoplasma bovis* wykazującego najlepsze właściwości w odniesieniu do badanych cech i potencjalnej jego przydatności do budowy szczepionki.

Wyniki zaprezentowanych powyżej badań własnych (H1-H4) wykazały, że zakażenia *M. bovis* stanowią duży problem zdrowotny i ekonomiczny w populacji bydła w Polsce, a sam drobnoustrój wykazuje silne właściwości immunostymulujące u tego gatunku zwierząt. Dodatkowo, brak na rynku europejskim komercyjnej szczepionki przeciwko zakażeniom *M. bovis* u bydła skłonił do podjęcia próby opracowania własnej eksperymentalnej szczepionki. Badania te podzielono na trzy główne etapy. W pierwszym z nich dokonano oceny wpływu różnych szczepów *M. bovis* na układ immunologiczny cieląt w warunkach eksperymentalnych w celu wyboru szczepu wykazującego najlepsze właściwości w odniesieniu do badanych cech. Badanie przeprowadzono na 24 cielętach w wieku około 5 tygodni. W doświadczeniu użyto jedynie cielęta wolne od zakażenia *M. bovis*, co zostało wcześniej potwierdzone badaniem mikrobiologicznym i serologicznym. Cielęta podzielono na cztery równe grupy: trzy doświadczalne i jedną kontrolną. Cielęta grup doświadczalnych zostały poddane dotchawicowej inokulacji jednym z trzech szczepów *M. bovis*, z kolei zwierzęta grupy kontrolnej otrzymały analogicznie sterylną sól fizjologiczną. Do inokulacji cieląt I grupy doświadczalnej (E1) użyto krajowego szczepu *M. bovis* wyizolowanego od krowy z objawami zapalenia gruczołu mlekowego. Cielęta II grupy

doświadczalnej (E2) zakażono szczepem *M. bovis* izolowanym z płuc 5-miesięcznego cielęcia padłego na skutek zapalenia płuc, z kolei do inokulacji cieląt III grupy doświadczalnej (E3) użyto szczepu *M. bovis* wyizolowanego z zawartości żołądka poronionego płodu bydłowego. Dwa ostatnie szczepy wyizolowano na terenie Wielkiej Brytanii i otrzymano dzięki uprzejmości dr. Rogera Aylinga z Animal and Plant Health Agency (Weybridge). Zwierzęta wszystkich grup doświadczalnych otrzymały równą objętość inokulatu, tj. 23 ml o zbliżonej gęstości dla poszczególnych grup: $1,98 \times 10^7$ (E1), $1,65 \times 10^7$ (E2) oraz $1,58 \times 10^7$ (E3) jednostek wiążących kolonię (colony-forming unit, CFU) na 1 ml. Grupa kontrola otrzymała natomiast analogicznie sterylny zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS). Krew oraz wymazy z jamy nosowo-gardłowej pobrano tuż przed inokulacją cieląt (próba zerowa), następnie codziennie aż do 7 dnia obserwacji i kontynuowano w odstępach tygodniowych aż do 4 tygodnia po zakażeniu (H-5: Dudek K., Bednarek D., Ayling R.D., Szacawa E.: **Immunomodulatory effect of *Mycoplasma bovis* in experimentally infected calves. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2013, 57, 499-506** i H-6: Dudek K., Bednarek D., Szacawa E., Rosales R.S., Ayling R.D.: **Flow cytometry follow-up analysis of peripheral blood leukocyte subpopulations in calves experimentally infected with field isolates of *Mycoplasma bovis*. Acta Veterinaria Hungarica 2015, 63, 167-178**). Wymazy z jamy nosowo-gardłowej oceniane były pod kątem obecności bakterii z rodzaju *Mycoplasma* metodą hodowlaną na podłożach płynnych i stałych, a także w kierunku obecności antygeny *M. bovis* przy użyciu komercyjnego zestawu ELISA. Z kolei w surowicy krwi określano obecność specyficznych przeciwciał anti-*M. bovis* z wykorzystaniem komercyjnego zestawu ELISA. U wszystkich badanych cieląt tuż przed inokulacją oraz u zwierząt kontrolnych przez cały okres doświadczenia nie izolowano antygeny *M. bovis* z wymazów z jamy nosowo-gardłowej. Z kolei u wszystkich grup doświadczalnych antygen *M. bovis* izolowany był już od pierwszego dnia po zakażeniu i stan ten utrzymywał się u przynajmniej jednego osobnika z grupy aż do 28 dnia po inokulacji. Brak obecności specyficznych przeciwciał anti-*M. bovis* stwierdzono u wszystkich badanych cieląt tuż przed zakażeniem oraz u zwierząt kontrolnych aż do końca doświadczenia. Z kolei u cieląt wszystkich grup doświadczalnych obecność specyficznych przeciwciał anti-*M. bovis* była notowana między 14 a 28 dniem po inokulacji. W ciągu kilku dni po zakażeniu cielęta wszystkich grup doświadczalnych wykazywały objawy kliniczne ze strony układu oddechowego (wypływ z jamy nosowo-gardłowej, kaszel) oraz podwyższoną ciepłotę wewnętrzną

ciała, w odróżnieniu od zwierząt kontrolnych, u których badanie kliniczne nie wykazywało odchyień od normy. W celu oceny wpływu *M. bovis* na układ immunologiczny cieląt w pierwszym etapie przebadano surowice wszystkich zwierząt pod kątem obecności wybranych parametrów immunologicznych, takich jak stężenie białka całkowitego i zawartość gamma globulin z podziałem na klasy IgA, IgM i IgG, koncentrację wybranych APPs, takich jak Hp i SAA, a także stężenie cytokin, tj. interferonu- γ (IFN- γ) i interleukiny-4 (IL-4). Stężenie białka całkowitego oznaczono metodą biuretową, natomiast pozostałych parametrów - przy użyciu oddzielnych komercyjnych zestawów ELISA. W zależności od użytego szczepu *M. bovis* obserwowano stymulację lub supresję syntezy wybranych parametrów immunologicznych. Stymulację produkcji gamma globulin obserwowano w grupie cieląt E2 i E3, z kolei istotne podwyższenie stężenia IL-4 notowano w grupie doświadczalnej E1. Cechą wspólną dla trzech badanych szczepów *M. bovis* była natomiast wyraźna aktywacja APR, która przejawiała się podwyższeniem stężenia Hp i SAA w pierwszych dniach po zakażeniu we wszystkich grupach doświadczalnych. Z drugiej strony, istotne obniżenie zawartości białka całkowitego obserwowane było w grupie E3, z kolei wyraźna supresja produkcji IgA była notowana we wszystkich grupach doświadczalnych **(H-5: Dudek K., Bednarek D., Ayling R.D., Szacawa E.: Immunomodulatory effect of *Mycoplasma bovis* in experimentally infected calves. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2013, 57, 499-506).**

W celu szczegółowej oceny wpływu wybranych szczepów *M. bovis* na układ immunologiczny cieląt co przedstawiono w publikacji **(H-6: Dudek K., Bednarek D., Szacawa E., Rosales R.S., Ayling R.D.: Flow cytometry follow-up analysis of peripheral blood leukocyte subpopulations in calves experimentally infected with field isolates of *Mycoplasma bovis*. Acta Veterinaria Hungarica 2015, 63, 167-178)** we krwi pełnej wszystkich badanych zwierząt oznaczono parametry hematologiczne takie jak: ogólna liczba leukocytów, z uwzględnieniem podziału na neutrofile, limfocyty oraz komórki średniej wielkości stanowiące sumaryczną wartość monocytów, eozynofilów i bazofilów. Badania hematologiczne przeprowadzono z użyciem analizatora hematologicznego. W badanym materiale wykonano również szczegółową analizę fenotypową limfocytów krwi obwodowej metodą cytometrii przepływowej. We krwi pełnej wszystkich badanych cieląt oznaczono markery powierzchniowe (cluster of differentiation antygen, CD) na limfocytach, takie jak CD2⁺ (limfocyty T),

CD4⁺ (limfocyty T pomocnicze, Th), CD8⁺ (limfocyty cytotoksyczne/supresyjne, T c/s) oraz WC4⁺ (limfocyty B). Dodatkowo użyte w doświadczeniu szczepy *M. bovis* poddano szczegółowej analizie sekwencyjnej z zastosowaniem metody MLST (multilocus sequence typing). Kierunek zmian badanych parametrów immunologicznych zależny był od rodzaju szczepu wykorzystanego do inokulacji cieląt. Wyraźne podwyższenie ogólnej liczby leukocytów obserwowano w grupie E1, co miało odzwierciedlenie we wzroście liczby neutrofilów. Wartości tych parametrów kształtowały się odmiennie w przypadku cieląt grupy E2 i E3, u których notowano generalnie ich obniżenie w odniesieniu do kontroli, z wyjątkiem pierwszego dnia po inokulacji. Wzrost ogólnej liczby leukocytów prawdopodobnie był spowodowany stymulacją produkcji i recyrkulacji neutrofilów. Z kolei spadek wartości tego parametru był wypadkową migracji neutrofilów do tkanek docelowych (Salmon i Higgs 1987). W grupie E3 obserwowano również spadek liczby limfocytów w porównaniu do pozostałych grup zwierząt. Badania *in vitro* przeprowadzone przez Vanden Bush i Rosenbush (2003) wykazały ekspresję CD4⁺ i CD8⁺ w następstwie zakażenia *M. bovis*. Własna analiza fenotypowa limfocytów krwi obwodowej wykazała stymulację produkcji limfocytów T w grupie doświadczalnej E2 i E3, co miało przełożenie w podwyższonej wartości CD4⁺. Z kolei, w grupie cieląt E1 jedynie niewielka stymulacja produkcji limfocytów Th była rekompensowana przez podwyższenie odsetka limfocytów B. U pozostałych grup doświadczalnych odpowiedź immunologiczna zależna od limfocytów B nie była wyraźnie zaznaczona i miała przełożenie w stopniu intensywności produkcji specyficznych przeciwciał anti-*M. bovis* co zaprezentowano w publikacji **H5**. W grupie E1 obserwowano także przeważający w odniesieniu do pozostałych grup doświadczalnych wzrost stosunku CD4:CD8. Brak równowagi tego parametru może stanowić zatem wskaźnik stymulacji lub supresji odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów T i przez to stanowić pewne znaczenie diagnostyczne. U wszystkich grup doświadczalnych obserwowano natomiast zbliżony lub niższy niż u kontroli odsetek limfocytów T c/s, zwłaszcza w grupie E1, co mogło mieć związek z przemieszczeniem tych komórek do tkanek docelowych i ich lokalne działanie cytotoksyczne. Z kolei wyniki analiz sekwencyjnych z zastosowaniem metody MLST wykazały różnice w przynależności badanych szczepów *M. bovis* do różnych typów sekwencyjnych. Pomimo odmiennych typów sekwencyjnych dla angielskich izolatów, tj. odpowiednio ST30 (izolat płucny) i ST32 (izolat z zawartości żołądka), sklasyfikowano je do jednego kompleksu klonalnego (clonal complex 1).

Natomiast krajowy izolat *M. bovis* otrzymał typ sekwencyjny ST36, który nie wykazywał przynależności do żadnych uprzednio scharakteryzowanych kompleksów klonalnych.

Na podstawie oceny wyników wszystkich parametrów immunologicznych wybrano do dalszych badań krajowy szczep *M. bovis*, który wykazywał najlepsze właściwości w odniesieniu do badanych cech.

Ad.4. Wybór odpowiedniej kombinacji adiuwantów spełniających najlepsze właściwości w odniesieniu do badanych cech i potencjalnej ich przydatności do budowy szczepionki.

Drugim etapem badań nad opracowaniem własnej szczepionki (w oparciu o wybrany w pierwszym etapie badań eksperymentalnych polski szczep *M. bovis*) była ocena różnych rodzajów adiuwantów mająca na celu wybór takiej ich kombinacji, która wykazywać będzie najlepsze właściwości w odniesieniu do badanych cech. Wyniki tych badań przedstawiono w publikacji (**H-7: Dudek K., Bednarek D., Ayling R.D., Szczotka M., Iwan E., Kocki J.: Analysis of the immune response of calves to various saponin-based adjuvants for an experimental *Mycoplasma bovis* vaccine. Acta Veterinaria Hungarica 2018, 66, 226-240**). Badania przeprowadzono na 24 cielętach w wieku około 5 tygodni, które zostały podzielone losowo na cztery równe grupy: trzy doświadczalne i jedną kontrolną. Do badań wykorzystano cielęta wolne od *M. bovis* co zostało potwierdzone metodą mikrobiologiczną i serologiczną. Do przygotowania wszystkich rodzajów mieszanin zawiesiny szczepu *M. bovis* i odpowiedniego adiuwantu wykorzystano wyselekcjonowany w pierwszym etapie badań polski szczep *M. bovis*. Cielęta I grupy doświadczalnej (S) otrzymały podskórnie mieszaninę szczepu *M. bovis* z saponiną. Zwierzętom II grupy doświadczalnej (S+E) została podana podskórnie mieszanina szczepu *M. bovis* z saponiną, do której został dodany dodatkowy adiuwant - Emulsigen[®]. Cielęta III grupy doświadczalnej (S+E+T) otrzymały podskórnie mieszaninę jak cielęta grupy S+E, którą wzbogacano o inny adiuwant - octan α -tokoferolu. Cielęta wszystkich grup doświadczalnych otrzymały mieszaninę w równej objętości, tj. 8 ml/zw. i koncentracji równej $6,25 \times 10^7$ CFU/ml. W doświadczeniu saponina spełniała dwojaką funkcję, adiuwantu oraz inaktywatora komórek mykoplazmowych. Grupa kontrolna cieląt otrzymała natomiast analogicznie „placebo” w postaci jałowego roztworu PBS. Krew oraz wymazy z jamy nosowo-

gardłowej zostały pobrane od wszystkich cieląt bezpośrednio przed doświadczeniem (próba zerowa), kolejne codziennie aż do 7 dnia obserwacji, a następnie w tygodniowych odstępach aż do 12 tygodnia po inokulacji (84 dzień doświadczenia). Wymazy z jamy nosowo-gardłowej przebadano w kierunku obecności antygeny *M. bovis*, z kolei w surowicy krwi określano obecność specyficznych przeciwciał anti-*M. bovis*. Obydwa oznaczenia wykonano z wykorzystaniem oddzielnych komercyjnych zestawów ELISA. Oznaczenia specyficznych przeciwciał kontynuowano aż do 24 tygodnia po iniekcji. We krwi pełnej wszystkich cieląt oznaczono następujące parametry immunologiczne: ogólną liczbę leukocytów z podziałem na granulocyty, limfocyty i monocyty z wykorzystaniem analizatora hematologicznego oraz obecność markerów powierzchniowych CD na limfocytach krwi obwodowej, tj. limfocyty T (CD2⁺), limfocyty Th (CD4⁺), limfocyty T c/s (CD8⁺) oraz limfocyty B (WC4⁺) za pomocą cytometra przepływowego. Z kolei w surowicy krwi wykonano badania w kierunku innych wskaźników odporności, takich jak: stężenie wybranych APPs, tj. Hp i SAA oraz koncentracja cytokin: IFN- γ i IL-4. Wszystkie te oznaczenia wykonano z zastosowaniem oddzielnych komercyjnych zestawów ELISA. Natomiast stężenie pozostałych cytokin w surowicy krwi, takich jak interleukiny IL-6, IL-10 i IL-12 oraz czynnika martwicy nowotworu- α (TNF- α) oznaczono z wykorzystaniem cytometrii. Wszystkie cielęta poddane były standardowemu badaniu klinicznemu. W odpowiedzi na iniekcję zawiesiny szczepu i odpowiedniej kombinacji adiuwantu u zwierząt wszystkich grup doświadczalnych obserwowano przejściowy wzrost ciepłoty wewnętrznej ciała, który ustąpił po upływie kilku dni po iniekcji. U jednego cielęcia grupy S+E+T obserwowano śluzowy wypływ z jamy nosowo-gardłowej w 6 dniu po iniekcji. Z kolei u niektórych zwierząt grup doświadczalnych zanotowano niewielkiego stopnia obrzęk tkanek podskórnych w miejscu iniekcji, który uległ resorpcji po upływie kilku dni po iniekcji. U wszystkich badanych cieląt nie wykazano obecności antygeny *M. bovis* przez cały okres trwania doświadczenia. Bezpośrednio przed doświadczeniem u wszystkich badanych cieląt oraz u zwierząt kontrolnych przez cały czas trwania doświadczenia nie wykazano obecności specyficznych przeciwciał anti-*M. bovis* w surowicy. Już od 2 tygodnia po iniekcji we wszystkich grupach doświadczalnych obserwowano istotny wzrost odsetka przeciwciał w porównaniu do grupy kontrolnej, który utrzymywał się aż do końca doświadczenia, tj. do 24 tygodnia po iniekcji. Najwyższy odsetek specyficznych przeciwciał obserwowany był jednak w grupie S+E. Pomimo wyraźnego pobudzenia odporności humoralnej co wykazano, należy podkreślić

również wyjątkowe znaczenie odpowiedzi komórkowej w eliminacji tej bakterii z organizmu gospodarza co jest obecnie eksponowane (Nicholas i wsp. 2017). W pierwszym dniu po iniekcji podczas realizacji własnych badań obserwowano u zwierząt doświadczalnych istotny wzrost ogólnej liczby leukocytów, który wynikał z podwyższonej w tym czasie liczebności granulocytów i monocytów. W pozostałych dniach doświadczenia wartości te były raczej zbliżone lub niższe w porównaniu do kontrolnych. Z kolei liczba limfocytów w grupie S+E oraz S+E+T była generalnie obniżona w porównaniu do kontroli przez większość doświadczenia, w odróżnieniu do grupy S, gdzie obserwowano raczej zbliżone do kontroli wartości. Obserwowana limfopenia była prawdopodobnie wynikiem recyrkulacji tych komórek. Analiza fenotypowa limfocytów krwi obwodowej wykazała generalną stymulację odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów T u wszystkich grup doświadczalnych, chociaż jej kierunek zależny był od użytej kombinacji adiuwantów. Wyraźny wzrost odsetka markerów CD2⁺ i CD4⁺ obserwowano u cieląt grupy S+E w porównaniu z kontrolą, z kolei u pozostałych grup doświadczalnych wartości tych parametrów były raczej zbliżone do kontroli. U tych grup z kolei przeważała stymulacja odsetka markera dla limfocytów T c/s. Z kolei odsetek limfocytów B był podwyższony w różnych dniach obserwacji u wszystkich grup doświadczalnych, jednak z przewagą dla grupy S+E. Limfocyty T pomocnicze odpowiedzialne są bowiem za sekrecję cytokin, które uczestniczą w różnicowaniu limfocytów B do komórek plazmatycznych, w konsekwencji prowadząc do produkcji przeciwciał (Hermeyer i wsp. 2012). Stan ten tłumaczy najbardziej znaczącą stymulację produkcji specyficznych przeciwciał anti-*M. bovis* w tej grupie cieląt. Z kolei analiza koncentracji wybranych cytokin wykazała wzrost wartości IFN- γ u wszystkich grup doświadczalnych w porównaniu z kontrolą w pierwszych dniach po iniekcji, z kolei stężenie IL-4 było podwyższone jedynie w grupie S+E+T oraz S+E i tylko w niektórych dniach obserwacji. Badania przeprowadzone przez Vanden Bush i Rosenbusch (2003) wykazały dominującą rolę odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów Th2 w odpowiedzi na zakażenie *M. bovis*, co miało odzwierciedlenie w przeważającej stymulacji IL-4. W badaniach tych wykazano również stymulację obydwu subpopulacji komórek CD4⁺ i CD8⁺, jednak w doświadczeniu tym aktywację wspomnianych parametrów obserwowano po stymulacji antygenem *M. bovis* obwodowych komórek jednojądrzastych izolowanych od cieląt zakażonych eksperymentalnie *M. bovis* (Vanden Bush i Rosenbusch 2003). Z kolei odpowiedź immunologiczna zależna od limfocytów Th1 charakteryzuje się

przeważającą ekspresją IFN- γ , ze znikomą lub brakiem odpowiedzi ze strony IL-4 (Estes i wsp. 1995; Vanden Bush i Rosenbusch 2003). Ocena stężenia cytokin oznaczanych cytometrycznie wykazała natomiast generalne podwyższenie koncentracji IL-6 w grupie S+E. U pozostałych grup doświadczalnych wartości tego parametru były zbliżone do kontroli, z wyjątkiem 84 dnia obserwacji gdzie wykazano istotne jego obniżenie. Stężenie TNF- α u wszystkich grup doświadczalnych było raczej zbliżone do kontroli, z wyjątkiem 56 dnia obserwacji dla grupy S+E z pewnym podwyższeniem wartości tego parametru. IL-6 i TNF- α uważane są za prozapalne cytokiny i spełniają funkcję regulatorową w odniesieniu do innych cytokin (Knolle i wsp. 1995; Schindler i wsp. 1990; van Miert 1995). Podobne zależności jak w przypadku TNF- α wykazano dla IL-10, cytokiny związanej z limfocytami Th2, jednak w 56 dniu po iniekcji wartości interleukiny były wyraźnie obniżone w grupie S w porównaniu z kontrolą (O'garra i Vieira 2004; Saraiva i O'Garra 2010). Stężenie IL-12p70 było natomiast podwyższone w grupie S+E i S+E+T w porównaniu z kontrolą we wszystkich dniach obserwacji, z przewagą jednak dla pierwszej z grup. W przypadku grupy S wartości tego parametru były zbliżone do kontroli. Z kolei koncentracja IL-12p40 u wszystkich grup doświadczalnych była generalnie zbliżona do kontroli, z wyjątkiem 28 dnia obserwacji, gdzie wykazano statystycznie istotny wzrost wartości tego parametru w grupie S+E. IL-12 znana jest bowiem z udziału w regulacji odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów Th1 (Farias i wsp. 2016). Wyniki własnych analiz w odniesieniu do cytokin wskazują natomiast, że odpowiedź immunologiczna na iniekcję mieszaniny szczepu *M. bovis* i odpowiednich adiuwantów na bazie saponiny zależna jest raczej od limfocytów Th1 lub jest to odpowiedź mieszana, Th1/Th2. Z kolei w dotychczas prowadzonych badaniach z udziałem komercyjnych szczepionek przeciwko zakażeniom *M. bovis*, czy wcześniej już wspomnianej szczepionki żywej, nie wykazano istotnych zmian w ocenie wybranych cytokin (Soehnen i wsp. 2011; Zhang i wsp. 2014). W prezentowanej publikacji u grup doświadczalnych wykazano wyraźną stymulację produkcji Hp i SAA w pierwszych dniach po iniekcji. Przeważające wartości obydwu tych białek były obserwowane jednak w grupie S+E+T oraz S+E. Dotychczas wykazano, że niektóre z cytokin, takie jak IL-6 czy TNF- α , pośredniczą w syntezie APPs (Gruys i wsp. 2005; Heinrich i wsp. 1990). Zatem w przypadku niektórych grup doświadczalnych, jak S+E, gdzie wykazano pewną stymulację produkcji IL-6, można dopatrywać się jej udziału w podwyższonej koncentracji wybranych APPs. Wzrost stężenia SAA u wszystkich grup doświadczalnych mógł mieć związek z wykazaną na

modelu człowieka rekrutacją i migracją leukocytów oraz ich infiltracją w obrębie docelowych tkanek, z drugiej zaś strony zdolność tego białka do hamowania wybuchu tlenowego komórek układu białokrwinkowego może zapobiegać uszkodzeniom tkanek przez produkowane w tym procesie reaktywne formy tlenu (Badolato i wsp. 1994; Linke i wsp. 1991). Z kolei stymulacja produkcji Hp u cieląt doświadczalnych również potwierdziła korzystne działanie zastosowanych kombinacji adiuwantów, z uwagi na przeciwzapalne i antyoksydacyjne właściwości tego białka (Oh i wsp. 1990).

Reasumując, wyniki własnych badań wskazują, że zastosowane kombinacje adiuwantów na bazie saponiny skutecznie stymulowały zarówno humoralną, jak i komórkową odpowiedź immunologiczną cieląt, jednak z wyraźną przewagą na rzecz połączenia saponiny z Emulsigenem®.

W celu szczegółowej oceny różnych rodzajów adiuwantów jako potencjalnych kandydatów do opracowania eksperymentalnej szczepionki przeciwko zakażeniom *M. bovis* u bydła do ww. schematu doświadczenia dodano jeszcze jedną grupę doświadczalną - IV. Cielęta IV grupy doświadczalnej zostały poddane podskórnej iniekcji mieszaniny szczepu *M. bovis* i saponiny jak w przypadku II i III grupy doświadczalnej, do której dodano dodatkowo adiuwant posiadający w składzie dimer lizozymu - Lydium-KLP™ co przedstawiono w publikacjach (**H-8: Dudek K., Bednarek D.: T- and B-cell response analysis following calf immunisation with experimental *Mycoplasma bovis* vaccine containing saponin and lysozyme dimer. Journal of Veterinary Research 2017, 61, 433-437** i **H-9: Dudek K., Bednarek D.: Saponin-based *Mycoplasma bovis* vaccine containing lysozyme dimer adjuvant stimulates acute phase response in calves. Journal of Veterinary Research 2018, 62, 269-273**). Objętość mieszaniny oraz zawarta w nim koncentracja komórek mykoplazmowych była analogiczna jak w przypadku pozostałych grup doświadczalnych. Do dalszych badań laboratoryjnych pobrano krew według schematu pobrań jw. We krwi pełnej oznaczono obecność specyficznych markerów powierzchniowych CD na limfocytach krwi obwodowej (CD2⁺, CD4⁺, CD8⁺ i WC4⁺) z wykorzystaniem cytometrii przepływowej co przedstawiono w publikacji (**H-8: Dudek K., Bednarek D.: T- and B-cell response analysis following calf immunisation with experimental *Mycoplasma bovis* vaccine containing saponin and lysozyme dimer. Journal of Veterinary Research 2017, 61, 433-437**). Wyniki badań wykazały podwyższenie odsetka limfocytów T w pierwszych dniach po iniekcji

mieszaniny oraz jego kontynuację w końcowym okresie między 63 a 77 dniem obserwacji, co miało pewne przełożenie w charakterze zmian limfocytów T pomocniczych. W pozostałych dniach obserwacji odsetek obydwu tych parametrów był zbliżony lub niższy w porównaniu do kontroli. Z kolei analiza fenotypowa pozostałych parametrów wykazała generalną stymulację produkcji limfocytów T c/s oraz limfocytów B w grupie cieląt doświadczalnych przez niemal cały okres trwania doświadczenia. Wyniki tych badań są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami (H7) gdzie wykazano wzmożenie komórkowej odpowiedzi immunologicznej w następstwie iniekcji mieszaniny szczepu *M. bovis* w połączeniu z adiuwantem na bazie saponiny, zależnej od limfocytów T i B. Ponadto w oparciu o te badania, a także obserwacje innych autorów dowiedziono, że szczepionka przygotowana w oparciu o całą komórkę *M. bovis* jest zdolna do stymulacji proliferacji limfocytów bydłecych (Mulongo i wsp. 2013).

Z kolei w surowicy krwi oznaczono koncentrację białek ostrej fazy, tj. Hp i SAA oraz wybranych cytokin, takich jak IFN- γ i IL-4 przy użyciu oddzielnych dla każdego z parametrów, komercyjnych zestawów ELISA, co zaprezentowano w publikacji (H-9: Dudek K., Bednarek D.: **Saponin-based *Mycoplasma bovis* vaccine containing lysozyme dimer adjuvant stimulates acute phase response in calves. Journal of Veterinary Research 2018, 62, 269-273**). W odpowiedzi na iniekcję zawiesiny zawierającej dimer lizozymu jako adiuwant wykazano statystycznie istotne podwyższenie stężenia SAA, zwłaszcza w pierwszych dniach obserwacji. Wzrost ten był obserwowany także w końcowym etapie doświadczenia, tj. w 56 i 84 dniu obserwacji. Stymulacja produkcji Hp nie była aż tak spektakularna jak w przypadku SAA i utrzymywała się jedynie do 2 dnia po iniekcji zawiesiny. W pierwszych dniach po iniekcji mieszaniny szczepu i dwóch adiuwantów, saponiny i dimeru lizozymu, notowano również istotne podwyższenie koncentracji IFN- γ , z kolei stężenie IL-4 znajdowało się w tej grupie doświadczalnej podobnie jak u kontroli poniżej granicy wykrywalności dla tego parametru. Wyniki tych badań w odniesieniu do stymulacji produkcji wybranych APPs oraz IFN- γ były zgodne z wcześniejszymi obserwacjami (H7) i potwierdziły korzystny wpływ zaproponowanej kombinacji adiuwantów na odporność badanych cieląt w kontekście wzmocnienia przeciwbakteryjnych i antyzapalnych mechanizmów obronnych. Z kolei obserwowana stymulacja produkcji IFN- γ w grupie doświadczalnej, co zostało wykazane w badaniach

innych autorów nad wpływem dimeru lizozymu na układ immunologiczny prosiąt, jest raczej wynikiem oddziaływania samego adiuwantu niż właściwością *M. bovis* (Siwicki i wsp. 1997). Dodatkowo, z uwagi na brak zmian w koncentracji IL-4 u cieląt doświadczalnych domniema się, że odpowiedź immunologiczna na tą kombinację adiuwantów zależna jest od limfocytów Th1.

Na podstawie uzyskanych wyników badań, które zaprezentowano w publikacjach **H7-9** stwierdzono, że najbardziej przydatną kombinacją adiuwantów w stosowanej zawieszynie iniekcyjnej *M. bovis* jest połączenie saponiny z Emulsigenem[®], z uwagi na najlepiej wyrażoną stymulację zarówno komórkowych, jak i humoralnych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej badanych cieląt po jej zastosowaniu.

Ad. 5. Opracowanie szczepionki i jej ocena w warunkach eksperymentalnych na cielętach.

Na podstawie wybranego w pierwszym etapie badań polskiego szczepu *M. bovis* oraz wyselekcjonowanego w drugim etapie odpowiedniego typu adiuwantu, tj. połączenia saponiny z Emulsigenem[®], opracowano eksperymentalną szczepionkę przeciwko zakażeniom tym drobnoustrojem, której skuteczność oceniono na cielętach w warunkach eksperymentalnych co zaprezentowano w publikacji (**H-10: Dudek K., Bednarek D., Ayling R.D., Kycko A., Szacawa E., Karpińska T.A.: An experimental vaccine composed of two adjuvants gives protection against *Mycoplasma bovis* in calves. Vaccine 2016, 34, 3051-3058**). Badania przeprowadzono na 18 cielętach w wieku 3-4 tygodni, które podzielono losowo na trzy równe grupy, szczepioną (Vac), zakażoną nieszczepioną, tzw. kontrolę dodatnią (PC) oraz kontrolę ujemną (NC). Do badań użyto cielęta wolne od zakażenia *M. bovis*, co zostało potwierdzone badaniem mikrobiologicznym, molekularnym i serologicznym. Cielęta grupy Vac zostały poddane podskórnej iniekcji eksperymentalnej szczepionki w objętości 8 ml/zw. i koncentracji komórek mykoplazmowych poddanych uprzednio inaktywacji saponiną równej $6,9 \times 10^7$ CFU/ml. W tym samym czasie cielęta grup kontrolnych (PC i NC) w analogiczny sposób otrzymały PBS. Po upływie 3 tygodni cielęta grupy Vac i PC zostały poddane dotchawicowej inokulacji homologicznym szczepem *M. bovis* w objętości 23 ml i koncentracji $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Wymazy z jamy

nosowo-gardłowej badanych wszystkich cieląt pobrano tuż przed szczepieniem (próba zerowa), a następnie w 7-dniowych odstępach do trzeciego tygodnia po szczepieniu i kolejno w 22, 25, 28, 35 i 42 dniu po szczepieniu, z kolei krew do dalszych badań laboratoryjnych pozyskano w 0, 1-7, 11, 15, 19, 23 i 39 tygodniu po szczepieniu. W okresie poszczepiennym, tj. w 1-4, 7 i 14 dniu w przypadku grupy Vac i NC oraz dla wszystkich cieląt w następstwie inokulacji w 1, 3, 7, 14 i 21 dniu po zakażeniu, dokonano oceny klinicznej zwierząt pod kątem następujących parametrów: częstotliwość oddechów/min, liczba tętna/min, ciepłota wewnętrzna ciała, a także obecności objawów chorobowych ze strony układu oddechowego (np. wypływ z jamy nosowo-gardłowej, kaszel, rzężenia itp.) oraz obecność/brak reakcji poszczepiennych w miejscu iniekcji. Po upływie 3 tygodni po zakażeniu, losowo wybrane po dwa cielęta z każdej grupy poddano ubojowi diagnostycznemu w celu oceny anatomo- i histopatologicznej pobranych narządów i tkanek. Wymazy z jamy nosowo-gardłowej oceniano pod kątem obecności bakterii z rodzaju *Mycoplasma* metodą hodowli na wybiórczo-namnażających podłożach płynnych i stałych oraz antygeny *M. bovis* z wykorzystaniem komercyjnego zestawu ELISA. Z kolei wycinki narządów, tj. płuc, węzłów chłonnych, wątroby, serca i nerek, badano pod kątem obecności materiału genetycznego (DNA) *M. bovis* z wykorzystaniem PCR, a także DNA dla *Mycoplasma* spp. przy użyciu metody PCR/DGGE (PCR/elektroforeza w gradiencie czynnika denaturującego). W surowicy krwi oznaczono natomiast obecność specyficznych przeciwciał anti-*M. bovis* z zastosowaniem komercyjnego zestawu ELISA oraz wybrane parametry immunologiczne: stężenie ogólnej puli bydlęcych immunoglobulin, z podziałem na klasy IgG, IgA i IgM przy użyciu oddzielnych komercyjnych zestawów ELISA. W następstwie szczepienia u cieląt grupy Vac obserwowano przejściowe podwyższenie liczby oddechów i tętna/min. Tylko u jednego cielęcia notowano obecność niewielkiego stopnia obrzęku tkanek miękkich w miejscu iniekcji, który po upływie 3 tygodni uległ resorpcji. Jedynie dwa cielęta wykazywały śluzowy wypływ z jamy nosowo-gardłowej, który utrzymywał się u jednego z nich do 4 dnia po szczepieniu. Ciepłota wewnętrzna ciała nie wykazywała natomiast odchyleń od normy. Z kolei w odpowiedzi na zakażenie zarówno u cieląt grupy Vac jak i PC obserwowano podwyższoną liczbę oddechów/min, jednak od 7 dnia po inokulacji stan ten utrzymywał się jedynie w grupie cieląt PC. W następstwie zakażenia u cieląt obydwu grup (PC i Vac) diagnozowano obecność śluzowego wypływu z jamy nosowo-gardłowej, jednak jego intensywność była wyraźnie większa w przypadku grupy PC.

Dodatkowo u jednego cielęcia grupy PC w okolicy przednich płatów płuc słyszalne były szmery oddechowe w postaci rzężeń. Z kolei u cieląt grupy NC podstawowe parametry kliniczne utrzymywały się w granicach normy. Nie obserwowano również w tej grupie zwierząt objawów chorobowych ze strony układu oddechowego. U wszystkich cieląt tuż przed rozpoczęciem właściwego doświadczenia oraz u cieląt grupy NC nie wykazano obecności *M. bovis*. Z kolei u cieląt grupy PC izolowano antygen *M. bovis* już od pierwszego dnia po zakażeniu i stan ten utrzymywał się aż do 21 dnia po inokulacji (łącznie 18 izolatów). Dla porównania, u cieląt grupy Vac zdiagnozowano obecność jedynie 2 izolatów w 4 i 7 dniu po zakażeniu, obydwa pochodziły od tego samego zwierzęcia. Natomiast wszystkie wycinki badanych narządów pochodzące od cieląt grupy NC i Vac były wolne od obecności antygeny *M. bovis* oraz DNA *Mycoplasma* spp. Z kolei u jednego z cieląt grupy PC wykazano obecność antygeny *M. bovis* w wycinkach płuc, węzłów chłonnych śródpiersiowych i nerki, natomiast u drugiego antygen izolowany był z serca. W odpowiedzi na szczepienie wykazano istotny wzrost odsetka specyficznych przeciwciał anti-*M. bovis* w grupie Vac w porównaniu do grup NC i PC już od 2 tygodnia po szczepieniu, który utrzymywał się aż do końca doświadczenia, tj. do 39 tygodnia po szczepieniu. Natomiast w grupie PC obserwowano stymulację produkcji specyficznych przeciwciał między 4 a 16 tygodniem po zakażeniu. W następstwie szczepienia obserwowano wyraźne podwyższenie stężenia całkowitej puli Ig bydłych w porównaniu do grup NC i PC w 21 i 35 dniu po szczepieniu, różnice istotne statystycznie obserwowano natomiast między grupą Vac i NC w 42 dniu po szczepieniu. Z kolei stężenie IgG w grupie Vac było wyraźnie wyższe niż u cieląt grupy NC i PC już od 14 dnia po szczepieniu i utrzymywało się aż do 42 dnia obserwacji, różnice między wartościami tego parametru były jednak wcześniej widoczne, bo już od 7 dnia i bardziej zaznaczone między grupą Vac i NC. Koncentracja IgM była na statystycznie istotnie wyższym poziomie u cieląt grupy Vac w 7 i 14 dniu po szczepieniu w porównaniu do grupy NC, a w dniu inokulacji osiągała wartości zbliżone do obydwu kontroli. Z kolei w następstwie zakażenia obserwowano wzrost wartości tego parametru u grup Vac i PC. Wartości te utrzymywały się na wyższym niż w grupie NC poziomie aż do 42 dnia obserwacji. W przypadku stężenia IgA notowano wzrost wartości tego parametru w grupie Vac już od 7 dnia po szczepieniu, a w 14 dniu obserwacji osiągało ono statystycznie istotnie wyższe wartości w porównaniu do obydwu grup kontrolnych. Z kolei w następstwie zakażenia obserwowano podwyższone stężenie IgA w grupie Vac

i PC aż do 42 dnia obserwacji w porównaniu do kontroli ujemnej (NC). W 28 dniu obserwacji, tj. w 7 dniu po zakażeniu, wzrost ten był istotny statystycznie u obydwu tych grup w porównaniu do grupy NC. Wyrażna stymulacja koncentracji IgA u szczepionych cieląt prawdopodobnie miała związek z aktywacją lokalnej odpowiedzi immunologicznej w obrębie tkanki limfatycznej błon śluzowych układu oddechowego (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT), co mogło ograniczyć kolonizację tych błon przez *M. bovis* (Underdown i Schiff 1986). Wyniki tych badań obaliły tezę, że szczepionki inaktywowane przeciwko *M. bovis* nie wykazują zdolności do stymulacji tego rodzaju odporności (Howard i Gourlay 1983). Dostępne na rynku amerykańskim szczepionki generalnie charakteryzowały się słabą immunogennością w odniesieniu do ocenianych klas Ig (IgA, IgM i IgG2) pomimo wielokrotnego ich podania, co było skorelowane z brakiem efektywności tych szczepionek w zakresie siewstwa *M. bovis* z górnych dróg oddechowych, rozwoju zmian chorobowych w obrębie płuc i narządu słuchu, a w niektórych przypadkach dochodziło nawet do zaostrzenia choroby (Maunsell i wsp. 2009; Soehnlen i wsp. 2011). Pewną stymulację produkcji IgG2 obserwowano natomiast po podaniu eksperymentalnej szczepionki pojednostkowej przygotowanej na bazie ekstraktów białka *M. bovis*, frakcji błony komórkowej bakterii i kombinacji dwóch adiuwantów, w tym EmulsigenuTM, jednak nie chroniła ona w pełni szczepionych zwierząt przed rozwojem choroby (Mulongo i wsp. 2013). Stymulację produkcji IgG specyficznych dla *M. bovis* notowano z kolei w następstwie iniekcji dwóch wariantów szczepionki żywej, atenuowanej wielokrotnością pasażu szczepów *M. bovis*. Szczepionka ta wykazywała pewne właściwości ochronne, jednak siewstwo *M. bovis* z górnych dróg oddechowych było wyraźne i utrzymywało się przez długi okres doświadczenia (Zhang i wsp. 2014). Ocena makroskopowa narządów cieląt grupy PC wykazała obecność zmian konsolidacyjnych tkanki płucnej o strukturze marmurkowatej, obecność ropni w płacie dodatkowym płuca prawego, powiększone węzły chłonne śródpiersiowe, zrosty w worku osierdziowym, przekrwienie płatów doczaszkowych płuc, a także nacieki tkanki chłonnej w nerkach. Z kolei u cieląt grupy Vac zdiagnozowano obecność jedynie małego stopnia przekrwień punktowych w płucach, niewielkiego stopnia obrzęki tkanki limfatycznej w nerkach oraz nieznaczne powiększenie węzła chłonnego śródpiersiowego u jednego z osobników. U cieląt grupy NC nie obserwowano natomiast żadnych zmian patologicznych w obrębie badanych narządów, z wyjątkiem nieznacznego stopnia przekrwień w obrębie płatów doczaszkowych płuc. Analiza histopatologiczna płuc cieląt grupy PC z zastosowaniem

mikroskopii świetlnej wykazała wielogniskowe włóknikowo-ropne zapalenie płuc i oskrzeli, hiperplazję tkanki limfatycznej związanej z oskrzelem (bronchus-associated lymphoid tissue, BALT), okołoskrzelowe nacieki komórek zapalnych złożone z makrofagów, neutrofilów, limfocytów i histiocyty, obecność wysięku w świetle oskrzeli i oskrzelików zawierającego włóknik oraz komórki zapalne, jak neutrofile, limfocyty i makrofagi, zapadnięcie pęcherzyków płucnych (atelektazja), ogniska rozedmy, pogrubione przegrody pęcherzyków z obecnymi w nich neutrofilami, makrofagami, erytrocytami i sporadycznie włóknikiem, a także przekrwienie naczyń krwionośnych z obecnością wynaczynień krwi. Z kolei ocena mikroskopowa preparatów węzłów chłonnych śródpiersiowych wykazała umiarkowanego stopnia hiperplazję części środowej grudek limfatycznych, w których obserwowano obecność makrofagów i neutrofilów. Analiza histopatologiczna płuc cieląt grupy Vac wykazała natomiast łagodną do umiarkowanej hiperplazję BALT, niewielkiego stopnia okołoskrzelowe nacieki złożone z komórek limfoidalnych i histiocytarnych, atelektazję i sporadycznie występującą rozedmę i obrzęk płuc. Z kolei obserwacja preparatów węzłów chłonnych śródpiersiowych wykazała łagodnego do umiarkowanego stopnia hiperplazję części środowej grudek chłonnych. Analiza histopatologiczna płuc cieląt grupy NC wykazała natomiast ogólny brak zmian patologicznych. Sporadycznie obserwowano jedynie przekrwienie naczyń krwionośnych z obecnością wynaczynień krwi, obrzęk płuc oraz niewielkie ogniska rozedmy i zwłóknienia. Z kolei obserwacja węzłów chłonnych śródpiersiowych nie wykazała zmian patologicznych w obrębie tego narządu. Analiza histopatologiczna płuc cieląt grupy PC z zastosowaniem mikroskopii elektronowej wykazała inwazję rzęsek i mikrokosmków nabłonka oddechowego oskrzelików oraz pneumocytów przez komórki przypominające mykoplazmy (tzw. mycoplasma like organisms), a także fagocytozę tych komórek przez pneumocyty typu II. Z kolei w obrębie węzłów chłonnych śródpiersiowych obserwowano obecność komórek przypominających mykoplazmy w granulocytach i komórkach prezentujących antygen oraz między tymi komórkami. Analiza histopatologiczna płuc cieląt grupy Vac wykazała obecność komórek przypominających mykoplazmy z uszkodzonymi błonami komórkowymi, a część z nich uległa rozkładowi gnilnemu. W obrębie płuc obserwowano również komórki przypominające mykoplazmy ze zmienionym filmem wokół bakterii. W obrębie węzłów chłonnych śródpiersiowych cieląt grupy Vac wykazano natomiast stymulację komórek prezentujących antygen, która przejawiała się obecnością wtrętów w karioplazmie tych komórek. Z kolei analiza histopatologiczna

płuc i węzłów chłonnych śródpiersiowych cieląt grupy NC nie wykazała obecności zmian patologicznych w obrębie tych narządów.

Zastosowanie eksperymentalnej szczepionki skutecznie stymulowało humoralną odpowiedź immunologiczną cieląt, przejawiającą się długotrwałym utrzymywaniem się (aż do 39 tygodnia po szczepieniu) podwyższonego miana specyficznych przeciwciał anty-*M. bovis*. W wyniku badań wykazano również ochronny wpływ szczepionki na ograniczenie siewstwa *M. bovis* z górnych dróg oddechowych i rozprzestrzenienia się bakterii w narządach i tkankach w przebiegu zakażenia, a także na występowanie objawów klinicznych ze strony układu oddechowego. Korzystne działanie szczepionki stwierdzono również w przypadku ograniczenia u szczepionych cieląt zmian anatomicznych i histopatologicznych, których nasilenie obserwowano natomiast u zwierząt nieszczepionych.

Podsumowanie

Przygotowanie pełnej receptury eksperymentalnej szczepionki w oparciu o polski szczep *M. bovis* w połączeniu z unikatowym na skalę światową kompleksem dwóch adiuwantów, tj. saponiny i Emulsigenu® oraz jej ocena w warunkach doświadczalnych, może posłużyć w przyszłości do opracowania komercyjnego preparatu do immunizacji bydła przeciwko zakażeniom *M. bovis*.

Opracowanie skutecznej immunoprofilaktyki zakażeń *M. bovis* pozwoliłoby zatem na znaczne ograniczenie strat w populacji bydła w Polsce, spowodowanych zwłaszcza schorzeniami układu oddechowego u tego gatunku zwierząt. Zrealizowane badania są pionierskie w kraju i dają w perspektywie nowe możliwości aplikacyjne. W przypadku podjęcia bowiem szerszej współpracy z podmiotem ze strony przemysłu farmaceutycznego, istnieje realna możliwość opracowania komercyjnej szczepionki przeciwko zakażeniom *M. bovis* u bydła wraz ze szczegółowymi zasadami jej stosowania u różnych grup wiekowych tego gatunku zwierząt. Na obecnym etapie wystąpiono już z wnioskiem o uzyskanie praw patentowych do własnego izolatu terenowego szczepu *M. bovis* zastosowanego w eksperymentalnej formulacji szczepionki.

Osiągnięcia:

1. Po raz pierwszy dokonano oceny sytuacji epizootycznej zakażeń *M. bovis* w populacji bydła w Polsce oraz dowiedziono, że zakażenia tym drobnoustrojem stanowią rosnący stale problem w odchowcie tego gatunku zwierząt.
2. Po raz pierwszy w kraju dowiedziono, że *M. bovis* należy do drobnoustrojów o zmiennej reaktywności immunologicznej, tj. posiada właściwości zarówno immunostymulujące, jak i immunosupresyjne.
3. Po raz pierwszy w kraju opracowano eksperymentalną szczepionkę przeciwko zakażeniom *M. bovis* u cieląt. Szczepionka ta stymulowała długotrwałą odporność humoralną, ograniczała rozwój objawów klinicznych choroby, pojawienie się zmian anatomo-patologicznych w obrębie narządów oraz siewstwo *M. bovis* z górnych dróg oddechowych w następstwie zakażenia, a także zapobiegała rozprzestrzenianiu się bakterii w obrębie tego samego organizmu, jak i między osobnikami w stadzie. Opracowanie skutecznej inaktywowanej szczepionki na bazie krajowego szczepu *M. bovis* i odpowiedniej kombinacji adiuwantów, tj. saponiny i Emulsigenu[®], stanowi osiągnięcie również na skalę światową.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Moja praca zawodowa obejmuje dwa nakładające się na siebie okresy, tj. pierwszy z nich obejmujący uczestnictwo w Studiach Doktoranckich na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie oraz kolejny, dotyczący rozpoczęcia pracy naukowej i jej kontynuacji w Zakładzie Chorób Bydła i Owiec PIWet-PIB w Puławach.

Zasadniczym celem uczestnictwa w Studiach Doktoranckich prowadzonych w latach 2003-2007 była realizacja przewodu doktorskiego początkowo pod kierunkiem prof. dr. hab. Tadeusza Studzińskiego, mojego pierwszego promotora i ówczesnego kierownika Zakładu Fizjologii Zwierząt UP w Lublinie. W ramach Studiów Doktoranckich, poza zasadniczym ich tokiem, do moich obowiązków należało również prowadzenie przez okres 3,5 roku zajęć dydaktycznych ze studentami II roku Wydziału Medycyny Weterynaryjnej z przedmiotu fizjologia zwierząt, a także jako współwykonawca realizowałam równoległe projekt KBN (PBZ-KBN-093/P06/2003),

którego tematyka dotyczyła oceny wpływu wodno-alkoholowego ekstraktu czosnku i allicyny na status zdrowotny prosiąt i ich matek.

W trakcie trwania Studiów Doktoranckich (2003-2007) w 2006 r. podjęłam pracę w Zakładzie Chorób Bydła i Owiec PIWet-PIB w Puławach. Po przejściu na emeryturę prof. dr. hab. Tadeusza Studzińskiego, promotorem mojej rozprawy doktorskiej został prof. dr hab. Dariusz Bednarek, zastępca kierownika Zakładu Chorób Bydła i Owiec. Od początku mojej pracy w PIWet-PIB brałam czynny udział w działalności naukowej i badawczej Zakładu Chorób Bydła i Owiec. W okresie 12 lat pracy w Zakładzie uczestniczyłam czynnie w realizacji 11 zadań i projektów badawczych, w tym:

- w latach 2008-2018 brałam udział w realizacji sześciu 3-letnich zadań (**w tym w 2 jako kierownik tematu**) prowadzonych w ramach działalności statutowej PIWet-PIB, których tematyka dotyczyła zagadnień związanych z wpływem zakażeń *Mannheimia haemolytica* na odpowiedź immunologiczną i zapalną u cieląt, etiopatogenezą i kontrolą zakażeń *Mycoplasma bovis* u bydła, a także oceną wpływu rekombinowanej formy bG-CSF oraz innowacyjnych dodatków paszowych na wybrane wskaźniki odpowiedzi immunologicznej cieląt
- w latach 2009-2018 uczestniczyłam, **jako osoba nadzorująca** badania, w realizacji dwóch 5-letnich zadań w ramach programu wieloletniego dotyczących oceny występowania zarazy płucnej bydła (CBPP) oraz zakaźnej bezmleczności owiec i kóz (CA) w Polsce
- w latach 2011-2014 jako współwykonawca realizowałam projekt badawczy rozwojowy NCBiR (PBR), którego tematyka dotyczyła oceny roli przeżuwaczy wolno żyjących jako rezerwuaru i wektora w szerzeniu się mykoplazm (NR12-0126-10/2011)
- od 2018 r. jako **kierownik zadania badawczego** dotyczącego doskonalenia metod identyfikacji zakażeń *Mycoplasma bovis* u bydła i oceny kształtowania się odpowiedzi immunologicznej z jej udziałem w przebiegu enzootycznej bronchopneumonii cieląt, biorę udział w realizacji projektu o dofinansowanie wiodących laboratoriów badawczych w ramach obszaru: rozwój potencjału badawczego Konsorcjum Naukowe KNOW „Zdrowe Zwierzę - Bezpieczna Żywność”

- od 2018 r. jako **kierownik zadania badawczego**: „Komórkowa odpowiedź immunologiczna u cieląt zakażonych eksperymentalnie *M. bovis*”, „Cell-mediated immunity of calves challenged with *M. bovis*” i **koordynator ze strony polskiej** realizuję wspólny projekt badawczy z Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences.

W latach 2015-2018 pełniłam funkcję **promotora pomocniczego** w przewodzie doktorskim mgr Olimpii Kursy pt. „Charakterystyka terenowych szczepów *Mycoplasma synoviae* w zakresie ich genotypu oraz patogenności w przebiegu klinicznych przypadków syndromu anomalii wierzchołka skorupy jaj u kur”.

Z innych sfer działalności naukowej i organizacyjnej od 2011 r. jestem odpowiedzialna za prowadzenie Sekretariatu Komisji Doktorskiej Rady Naukowej PIWet-PIB, a w latach 2010-2012 sprawowałam dodatkowo funkcję skarbnika Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych o/Puławy. Ponadto między 2013 a 2015 r. byłam członkiem Komisji Rewizyjnej PTNW tego oddziału.

W ramach działalności badawczej Zakładu Chorób Bydła i Owiec sprawuję funkcję **osoby nadzorującej** badania z zakresu zakażeń *M. bovis* u bydła, ważnego czynnika etiologicznego enzootycznej bronchopneumonii cieląt, jednej z kluczowych aktywności Zakładu oraz zarazy płucnej bydła i zakaźnej bezmleczności owiec i kóz, realizowanej w ramach działalności referencyjnej. Dla ww. jednostek chorobowych byłam autorem 5 procedur badawczych, a w przypadku dwóch z nich – również instrukcji na zlecenie Głównego Lekarza Weterynarii. Od 2015 r. sprawuję również funkcję kierownika ds. technicznych w Zakładzie Chorób Bydła i Owiec w odniesieniu do laboratoriów zlokalizowanych w strefie PCL2 Instytutu.

Szczegółowe dane na temat publikacji, realizowanych projektów, wygłoszonych referatów, udziału w konferencjach, działalności dydaktycznej, otrzymanych nagród, zrealizowanych staży naukowych, udziału w działalności badawczej Zakładu Chorób Bydła i Owiec oraz innych aktywności zestawiono w **załączniku nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego**.

Poniżej zaprezentowałam najważniejsze tematy moich osiągnięć naukowo-badawczych, z wyłączeniem tematyki opisanej w głównym osiągnięciu naukowym, na które składa się jednotematyczny cykl publikacji.

Gorączka endotoksynowa i tolerancja pirogenowa u gołębi

W początkowym okresie mojej pracy naukowej realizowanej w ramach Studiów Doktoranckich zajmowałam się głównie zagadnieniami związanymi z patomechanizmem gorączki endotoksynowej oraz tolerancji pirogenowej u gołębi. Niekompletne lub nawet często sprzeczne dane na temat kształtowania się zmian termoregulacyjnych, behawioralnych i immunologicznych w warunkach gorączki endotoksynowej i tolerancji pirogenowej u ptaków były motywem do podjęcia badań w tym zakresie. Głównym celem badań było wywołanie stanu gorączki endotoksynowej oraz tolerancji pirogenowej oraz szczegółowa ocena kierunku kształtowania się zmian behawioralnych i immunologicznych w tych warunkach. W następnej kolejności podjęto próbę przełamania stanu tolerancji pirogenowej.

Badania przeprowadzono na gołębiach (n=80), u których indukowano gorączkę endotoksynową za pośrednictwem lipopolisacharydu (LPS) *Escherichia coli* podawanego drogą dożylną iniekcji. Z kolei powtarzane iniekcje tego pirogeny posłużyły do wywołania stanu tolerancji pirogenowej u tych ptaków. W warunkach zarówno gorączki endotoksynowej, jak i tolerancji pirogenowej rejestrowano zmiany temperatury wewnętrznej i aktywności lokomotorycznej ptaków oraz badano u nich kształtowanie się wybranych parametrów odpowiedzi immunologicznej i zapalnej. Następnie podjęto próbę przełamania stanu tolerancji pirogenowej za pośrednictwem dożylnych iniekcji LPS *E. coli* i *Salmonella Abortus Equi*, w warunkach której obserwowano zmiany termoregulacyjne i behawioralne gołębi. Pomiaru temperatury wewnętrznej i aktywności lokomotorycznej badanych ptaków dokonano w oparciu o metodę biotelemetrii. W celu oceny wpływu iniekcji LPS na odpowiedź immunologiczną u gołębi we krwi pełnej dokonano oceny ogólnej liczby leukocytów oraz odsetka poszczególnych ich subpopulacji (leukogram). Krwinki białe liczono w komorze Bürkera, natomiast w celu wykonania leukogramu przygotowano rozmaz krwi, który barwiono metodą Pappenheima, a następnie z wykorzystaniem mikroskopu optycznego liczono poszczególne subpopulacje leukocytów, tj. granulocyty (heterofile, eozynofile i bazofile) oraz agranulocyty (limfocyty i monocyty). We krwi pełnej dokonano również analizy fenotypowej limfocytów krwi obwodowej, tj. limfocytów T (CD3⁺), limfocytów T pomocniczych (CD4⁺, Th) oraz limfocytów T supresorowo/cytotoksycznych (CD8⁺, Ts/c) z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Natomiast w surowicy krwi gołębi oznaczono następujące parametry:

zawartość białka całkowitego i gamma globulin, aktywność lizozymu oraz stężenie wybranych APPs, tj. ceruloplazminy (Cp), białka C-reaktywnego (CRP), ferrytyny, transferyny (Tf) i albuminy (Alb). Zawartość białka całkowitego oznaczono za pomocą metody biuretowej, z kolei stężenie gamma globulin - z zastosowaniem metody spektrofotometrycznej. Z kolei koncentrację wybranych APPs określono metodą spektrofotometryczną lub turbidymetryczną. Natomiast w celu oceny wpływu iniekcji LPS na odpowiedź zapalną u gołębi w surowicy krwi oznaczono zawartość następujących pierwiastków: Fe, Zn i Cu przy użyciu spektrometru fluorescencji rentgenowskiej oraz stężenie wybranych eikozanoidów, tj. prostaglandyn E₂ (PGE₂) i F2 α (PGF_{2 α}), leukotrienu B₄ (LTB₄) oraz tromboksanu B₂ (TXB₂) z zastosowaniem oddzielnych komercyjnych zestawów ELISA.

Wyniki badań potwierdziły występowanie dla tego gatunku ptaków okołodobowego rytmu temperatury wewnętrznej i aktywności lokomotorycznej, który przejawiał się wyższymi wartościami tych parametrów w czasie dnia w porównaniu z nocą. Rytm ten rzutował na charakter zmian termoregulacyjnych i behawioralnych u gołębi w odpowiedzi na jednokrotną iniekcję LPS *E. coli*, przy czym były one bardziej nasilone, a dominowała głównie gorączka oraz depresja aktywności lokomotorycznej. W warunkach gorączki endotoksynowej obserwowano stymulację produkcji niektórych komponentów swoistej odpowiedzi immunologicznej, tj. heterofilów, lizozymu oraz białka całkowitego. Z drugiej strony w warunkach tych wykazano wzrost produkcji składowych swoistej odporności, takich jak odsetek oznaczonych subpopulacji limfocytów T. W odpowiedzi na jednokrotną iniekcję LPS obserwowano również stymulację produkcji Cp, CRP i Tf, z kolei stężenie ferrytyny i Alb uległo obniżeniu. Jednokrotna iniekcja LPS wywołała również stymulację produkcji badanych prostaglandyn, jednych z najważniejszych mediatorów gorączki u zwierząt. W warunkach gorączki endotoksynowej obserwowano również wzrost produkcji LTB₄, ważnego czynnika chemotaktycznego dla heterofilów oraz spadek stężenia TXB₂, który z dużym prawdopodobieństwem wskazywał na zużycie tego związku na potrzeby śródnaczyniowych procesów krzepnięcia krwi wyraźnie nasilonych w przebiegu endotoksemii. Z kolei w przebiegu tolerancji pirogenowej obserwowano redukcję wzrostu temperatury wewnętrznej oraz wzmożenie aktywności lokomotorycznej gołębi w porównaniu do zmian tych parametrów w warunkach gorączki endotoksynowej. W odpowiedzi na powtarzane iniekcje LPS u gołębi obserwowano stymulację produkcji niektórych komponentów nieswoistej (lizozym)

i swoistej, jak odsetek limfocytów T, odpowiedzi immunologicznej. W warunkach tolerancji pirogenowej wykazano również stymulację produkcji negatywnych APPs, takich jak ferrytyna i Alb z jednej strony, z drugiej zaś obniżenie koncentracji niektórych pozytywnych APPs (CRP i Tf). Kolejne iniekcje LPS pogłębiały obserwowany w warunkach gorączki endotoksynowej stan hipoferremii infekcyjnej, wzmacniały produkcję Cu oraz normalizowały zawartość Zn w surowicy krwi gołębi. W odróżnieniu od kierunku kształtowania się zmian niektórych parametrów odpowiedzi zapalnej w warunkach gorączki endotoksynowej, powtarzane iniekcje LPS wywoływały obniżenie stężenia PGE₂ i PGF_{2α} oraz wzrost produkcji TXB₂, który był prawdopodobnie wynikiem lizy, a następnie resorpcji wewnątrznaczyniowych zakrzepów krwi (agregatów) złożonych z trombocytów. Z kolei w odpowiedzi na powtarzane iniekcje LPS, stężenie LTB₄ uległo dalszemu podwyższeniu, co wskazywać mogło na silną aktywizację komórek fagocytujących krwi, a w konsekwencji również na pobudzenie migracji tych komórek do tkanek objętych procesem zapalnym. Ostatnim etapem badań była próba przełamania stanu tolerancji na LPS *E. coli* z wykorzystaniem podwójnej dawki tego samego pirogeny lub LPS izolowanego z innego gatunku bakterii Gram-ujemnych, tj. *S. Abortus Equi*. Wyniki tych badań wykazały, że gołębie z ustaloną tolerancją pirogenową charakteryzowały się prawidłową reaktywnością na kolejne iniekcje LPS, co przejawiało się typowymi dla gorączki endotoksynowej zmianami termoregulacyjnymi i behawioralnymi u tych ptaków, tj. wzrostem temperatury wewnętrznej oraz depresją aktywności lokomotorycznej. Wyniki ww. badań zostały zawarte w mojej **pracy doktorskiej pt. „Wpływ lipopolisacharydu na wystąpienie i przebieg gorączki, kształtowanie się tolerancji pirogenowej oraz wskaźniki immunologiczne i zapalne u gołębi”**. Na podstawie rozprawy doktorskiej opublikowano następujące prace:

- **Dudek K.**, Bednarek D.: Cellular immune response of pigeons in the conditions of endotoxin fever and pyrogenic tolerance. *Pol J Vet Sci* 2011, 14, 127-133.
- **Dudek K.**, Bednarek D., Soszyński D., Kozłowska M.: Changes of internal temperature and locomotor activity under the conditions of endotoxin fever, pyrogenic tolerance and its suppression in pigeons. *Medycyna Wet* 2011, 67, 38-47.
- **Dudek K.**, Bednarek D. Siwicki A.K., Rokita E., Studziński T.: The effect of LPS injection on non-specific immune response in affected pigeons. *Pol J Vet Sci* 2013, 16, 723-729.

Wpływ preparatów na bazie czosnku na odporność prosiąt i ich matek oraz rozwój prosiąt

Kolejnym tematem mojej pracy naukowej realizowanym w trakcie trwania Studiów Doktoranckich były zagadnienia związane z oceną wpływu preparatów na bazie czosnku na status zdrowotny prosiąt i ich matek. Badania te realizowano w ramach projektu badawczego KBN (PBZ-KBN-093/P06/2003), którego byłam współwykonawcą. W pierwszym etapie tych badań wykazano korzystny wpływ podawania wodno-alkoholowego ekstraktu czosnku (aged garlic extract, AGE) i allicyny ciężarnym i będącym w okresie laktacji maciorom na wybrane parametry swoistej i nieswoistej odpowiedzi immunologicznej tych zwierząt, które przejawiały się wzrostem aktywności lizozymu i Cp, a także podwyższoną koncentracją białka całkowitego i gamma globulin w dniu porodu. Z kolei 7 dni przed spodziewanym terminem porodu wykazano wzrost aktywności lizozymu po podaniu AGE i allicyny. W tym okresie stężenie białka całkowitego i gamma globulin było podwyższone w następstwie podania AGE. Dodatkowo u tej grupy macior obserwowano wzrost aktywności Cp 7 dni po porodzie. W tym czasie po podaniu obydwu preparatów notowano podwyższoną koncentrację gamma globulin.

W kolejnym etapie badań dokonano oceny wpływu podawania AGE i allicyny ciężarnym i będącym w laktacji maciorom na wybrane wskaźniki swoistej i nieswoistej odpowiedzi immunologicznej prosiąt w różnych okresach ich życia (0 – 35 dnia życia). Po podaniu AGE i allicyny maciorom wykazano generalnie podwyższoną liczbę leukocytów, monocytów i limfocytów u prosiąt między 3 a 35 dniem życia, istotną z punktu widzenia mechanizmów obronnych zwłaszcza w 28 dniu życia, kiedy następuje odsadzenie prosiąt od matek. U prosiąt tych obserwowano również wzrost aktywności lizozymu i Cp. Z kolei ocena wpływu podawania maciorom AGE i allicyny na rozwój prosiąt między 0 a 56 dniem życia wykazała stymulację przyrostów masy ciała tych zwierząt już od urodzenia, a także generalny wzrost rozwoju narządów układu pokarmowego, który przejawiał się podwyższeniem masy wątroby, trzustki i żołądka oraz wzrostem długości dwunastnicy i jelita cienkiego. Z kolei stosunek masy trzustki do masy ciała prosiąt uległ generalnemu podwyższeniu po podaniu obydwu preparatów, natomiast w grupie prosiąt, których matki otrzymały allicynę obserwowano obniżenie stosunku wątroby/żołądka do masy ciała. W badaniach tych wykazano również korzystny wpływ AGE i allicyny na parametry morfologiczne kosmków

jelitowych w obrębie różnych odcinków jelita cienkiego, które widoczne były zwłaszcza między 7 a 35 dniem życia prosiąt.

Kolejnym etapem badań była ocena wpływu podawania AGE i allicyny na przyrosty masy ciała, rozwój narządów układu pokarmowego, parametry morfologiczne jelita cienkiego oraz niespecyficzne komponenty odpowiedzi immunologicznej prosiąt utrzymywanych w warunkach sztucznej maciory. Doustne podawanie ww. substancji powodowało istotny wzrost końcowej masy ciała 8-dniowych prosiąt oraz podwyższenie ciężaru właściwego żołądka (grupa otrzymująca podwójną dawkę AGE, AGE 2) i wątroby, a także znaczny spadek stosunku wątroby do masy ciała badanych zwierząt (grupa AGE 2). Zarówno AGE, jak i allicyna w większości stymulowały u badanych prosiąt rozwój badanych parametrów morfologicznych jelita cienkiego, takich jak: liczba, przekrój, wysokość i szerokość kosmków, głębokość krypt oraz grubość błony śluzowej, a także wzmagaly aktywność lizozymu i Cp w surowicy krwi tych zwierząt.

Wyniki badań wykazały korzystny efekt podawania AGE i allicyny na status zdrowotny i rozwój prosiąt, dlatego też preparaty te stanowią mogą z powodzeniem alternatywę dla antybiotykowych stymulatorów wzrostu do stosowania u tego gatunku zwierząt. Na podstawie ww. wyników opublikowano następujące prace:

- Tataro M.R., Śliwa E., **Dudek K.**, Mosiewicz J., Studziński T.: Effect of aged garlic extract and allicin administration to sows during pregnancy and lactation on body weight gain and gastrointestinal tract development of piglets. Part I. Bull Vet Inst Pulawy 2005, 49, 349-355.
- Tataro M.R., Śliwa E., **Dudek K.**, Kowalik S., Gawron A., Piersiak T., Dobrowolski P., Studziński T.: Effect of aged garlic extract and allicin administration to sows during pregnancy and lactation on body weight gain and gastrointestinal tract development of piglets: morphological properties of the small intestine. Part II. Bull Vet Inst Pulawy 2005, 49, 455-464.
- **Dudek K.**, Tataro M.R., Śliwa E., Siwicki A., Łuszczewska-Sierakowska I., Zipser J., Krupski W., Studziński T.: Effects of perinatal administration of aged garlic extract (AGE) and allicin on non-specific and specific defence mechanisms in sows. Pol J Environ Stud 2005, 14, Suppl. II, 69-72.

- Tataro M.R., Śliwa E., **Dudek K.**, Siwicki A.K., Kowalik S., Łuszczewska-Sierakowska I., Krupski W., Zipser J., Studziński T.: Influence of perinatal administration of aged garlic extract (AGE) and allicin to sows on some defence mechanisms in their piglets during postnatal life. *Pol J Environ Stud* 2005, 14, Suppl. II, 378-381.
- **Dudek K.**, Śliwa E., Tataro M.R.: Changes in blood leukocyte pattern in piglets from sows treated with garlic preparations. *Bull Vet Inst Pulawy* 2006, 50, 263-267.
- Tataro M.R., Śliwa E., **Dudek K.**, Gawron A., Piersiak T., Dobrowolski P., Mosiewicz J., Siwicki A., Studziński T.: Aged garlic extract and allicin improve performance and gastrointestinal track development of piglets reared in artificial sow. *Ann Agr Env Med* 2008, 15, 63-69.

Zaraza płucna bydła i zakaźna bezmleczność owiec i kóz

Od początku mojej pracy w Zakładzie Chorób Bydła i Owiec zajmowałam się zagadnieniami związanymi z zarazą płucną bydła (contagious bovine pleuropneumonia, CBPP) oraz zakaźną bezmlecznością owiec i kóz (contagious agalactiae, CA), dla których Zakład Chorób Bydła i Owiec pełni funkcję Laboratorium Referencyjnego. CBPP należy do chorób wysoce zakaźnych i zaraźliwych, której czynnikiem etiologicznym jest *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony variant (*MmmSC*). Zmiany chorobowe ograniczone są do układu oddechowego, jednak choroba wywołuje wysoką śmiertelność u zakażonych zwierząt. Aktualnie występowanie CBPP ograniczone jest do kontynentu afrykańskiego, a ostatni jej przypadek notowany był w Europie w 1999 r. (OIE Terrestrial Manual Contagious bovine pleuropneumonia 2018). Z kolei CA wywoływana jest głównie przez *Mycoplasma agalactiae*, a zasięg jej występowania obejmuje Europę, Azję, Afrykę i sporadycznie USA. Cechą charakterystyczną choroby są objawy zapalenia gruczołu mlekowego, stawów oraz rogówki i spojówki (OIE Terrestrial Manual Contagious agalactia 2018). W Polsce CBPP należy do chorób zwalczanych z urzędu, z kolei CA uznana została za chorobę podlegającą rejestracji. Aktualnie w Polsce nie notuje się zakażeń na tle *MmmSC* oraz *M. agalactiae*. Z uwagi jednak na stale obecne ryzyko wybuchu zakażenia, od 2009 r. w Zakładzie prowadzony jest monitoring w ramach programu wieloletniego PIWet-PIB, który corocznie obejmuje badania około 800 surowic w kierunku CBPP oraz 200 surowic w kierunku CA pochodzących ze wszystkich województw kraju.

W ramach badań monitoringowych przeprowadzonych w latach 2009-2011 przebadano 810 surowic pochodzących od bydła z 34 ferm zlokalizowanych na terenie 11 województw kraju (6 regionów). Surowice przebadano w kierunku obecności specyficznych przeciwciał anty-*MmmSC* z wykorzystaniem komercyjnego zestawów: ELISA i odczynu wiązania dopełniacza (OWD). Wyniki badań z użyciem metody ELISA wykazały obecność dwóch dodatnich oraz 135 wątpliwych surowic, które po weryfikacji drugim badaniem ELISA zredukowano do 52 wątpliwych i 85 ujemnych rezultatów. Z kolei badanie przeprowadzone z udziałem OWD jako metody uznanej za weryfikującą wykazało 100% ujemnych wyników, dlatego też wszystkie badane surowice uznano ostatecznie za ujemne. Z kolei w kierunku obecności specyficznych przeciwciał anty-*M. agalactiae* przebadano testem ELISA łącznie 719 surowic pochodzących z 52 ferm owiec zlokalizowanych na terenie 8 województw (5 regionów) oraz 232 surowice pobrane od kóz pochodzących z 4 ferm na terenie 4 województw (3 regiony). Wyniki badań wykazały obecność jednej wątpliwej surowicy otrzymanej od kozy, która okazała się ujemna w drugim weryfikującym badaniu ELISA.

Podczas realizacji projektu badawczego NCBiR (NR12-0126-10/2011) brałam udział w pionierskich badaniach nad oceną występowania mykoplazm u wolno żyjących przeżuwaczy na terenie Polski. W pierwszym etapie badań (2011-2012) dokonano analizy obecności specyficznych przeciwciał przeciwko następującym drobnoustrojom: *M. bovis*, *MmmSC*, *M. agalactiae* oraz *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (*Mccp*) u 23 żubrów pochodzących z północno-wschodniego regionu Polski. Do badań użyto komercyjnych zestawów ELISA (*M. bovis*, *MmmSC*, *M. agalactiae*), OWD (*MmmSC*) oraz testu aglutynacji lateksowej (*MmmSC*, *Mccp*). Wyniki badań wykazały u dwóch dorosłych żubrów obecność specyficznych przeciwciał anty-*M. bovis*. U jednego z tych żubrów obserwowano objawy kliniczne ze strony układu oddechowego oraz zmiany chorobowe w obrębie płuc, opłucnej i narządów układu rozrodczego, co mogło mieć związek z zakażeniem na tle *M. bovis*.

Badania te były kontynuowane w latach 2013-2014, gdzie przebadano łącznie 55 próbek surowic, wymazów z jamy nosowo-gardłowej i narządów wewnętrznych pobranych od 28 żubrów pochodzących ze wschodniego regionu Polski. W surowicach krwi oznaczono obecność specyficznych przeciwciał anty-*M. bovis*, *M. agalactiae*, *MmmSC* oraz *Mccp* z zastosowaniem testu ELISA, testu aglutynacji lateksowej, OWD i immunoblotingu. Z kolei próbki wymazów i narządów wewnętrznych (płuca, wątroba, nerka) przebadano w kierunku obecności DNA *M. bovis*, *MmmSC*, *Mycoplasma*

bovigenitalium, *Mycoplasma canis*, *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma canadense*, *Mycoplasma alkalescens*, *M. agalactiae*, *Mccp* oraz *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* z wykorzystaniem metody PCR/DGGE. Dodatkowo do wykrycia obecności DNA *M. bovis* zastosowano gatunkowo specyficzny PCR, natomiast w celu oceny obecności antygeny tej bakterii – antygenowy test ELISA. Wyniki badań wykazały obecność 6 surowic dodatnich w kierunku *M. bovis* oraz 4 dodatnich i dwóch wątpliwych dla *MmmSC*. Jeden z wątpliwych wyników w kierunku *MmmSC* otrzymany metodą ELISA został potwierdzony techniką OWD. Ostatecznie dodatnie i wątpliwe wyniki badań serologicznych w kierunku *MmmSC* zostały zweryfikowane metodą immunoblotting i uznane za ujemne. Dodatkowo test aglutynacji lateksowej w kierunku *MmmSC* wykazał 100% ujemnych wyników, a metoda PCR/DGGE nie potwierdziła obecności DNA tej bakterii w badanych próbkach. Podobnie jak w poprzednich naszych badaniach, nie wykryto obecności przeciwciał przeciwko *M. agalactiae* i *Mccp* u badanych żubrów. Z kolei wszystkie z 6 żubrów dodatnich w kierunku *M. bovis* wykazywały zmiany chorobowe ze strony układu oddechowego, co mogło mieć związek z zakażeniem na tle *M. bovis*. Inne metody nie wykazały jednak obecności *M. bovis* w badanych próbkach. Dlatego też obecność fałszywie dodatnich wyników nie może być w tym przypadku wykluczona. Z uwagi jednak na wyniki wcześniejszych naszych badań na żubrach oraz występowanie zaburzeń zdrowotnych na tle zakażeń *M. bovis* w populacji bizonów, istnieje potrzeba kontynuacji badań w tym zakresie (Dyer i wsp. 2008; Janardhan i wsp. 2010; Register i wsp. 2013).

Kolejne badania przeprowadzone w latach 2011-2014 dotyczyły oceny występowania mykoplazm u wolno żyjących przeżuwaczy należących do rodziny jeleniowatych. Łącznie przebadano 237 próbek: surowic, wymazów z jamy nosowo-gardłowej, wypłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych i wycinków płuc, które pobrano od 161 zwierząt, w tym: 96 jeleni, 19 danieli oraz 46 saren pochodzących z 5 regionów Polski. Surowice krwi przebadano w kierunku obecności specyficznych przeciwciał anty-*M. agalactiae* (ELISA), *Mccp* (test aglutynacji lateksowej, immunoblotting), *M. bovis* (ELISA) oraz *MmmSC* (ELISA, OWD i test aglutynacji lateksowej). Z kolei obecność DNA *M. bovis*, *M. agalactiae*, *Mccp*, *M. bovirhinis*, *MmmSC*, *Mycoplasma canis*, *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma canadense*, *Mycoplasma alkalescens* oraz *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* wykrywano za pomocą metody PCR/DGGE. Z kolei do oceny obecności antygeny *M. bovis* użyto antygenowy test

ELISA. Wyniki badań wykazały obecność jednej dodatniej surowicy w kierunku *M. bovis* otrzymanej od sarny pochodzącej z północno-zachodniego regionu Polski, u której nie stwierdzono zmian chorobowych w obrębie płuc typowych dla zakażeń tą bakterią, stąd wynik ten może być uznany za fałszywie dodatni. Z kolei u trzech jeleni z terenu wschodniego regionu kraju wykryto obecność specyficznych przeciwciał anti-*Mccp* testem aglutynacji lateksowej, jednak zostały one ostatecznie uznane za ujemne po przebadaniu metodą immunoblotting. Wyniki pozostałych badań serologicznych, mikrobiologicznych i molekularnych były ujemne. Na podstawie uzyskanych wyników nie można ostatecznie wykluczyć braku udziału zwierząt z rodziny jeleniowatych w szerzeniu zakażeń mykoplazmowych, chociaż nie stanowią one głównego rezerwuaru mykoplazm chorobotwórczych dla zwierząt gospodarskich. Na podstawie ww. wyników opublikowano następujące prace:

- **Dudek K.**, Bednarek D., Szacawa E.: *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony variant and *Mycoplasma agalactiae* antibodies in ruminants in Poland. Bull Vet Inst Pulawy 2012, 56, 453-457.
- Krzysiak M.K., **Dudek K.**, Krajewska M., Bednarek D., Szulowski K.: Serological studies to determine the occurrence of Johne's disease and mycoplasma infection in the Northern-East Polish population of European bison (*Bison bonasus*). Pol J Vet Sci 2014, 17, 721-723.
- **Dudek K.**, Bednarek D., Szacawa E., Ayling R.D., Krzysiak M.K., Marczuk J.: A serological and molecular study on the occurrence of mycoplasmas in European bison (*Bison bonasus*) from two areas of Eastern Poland. Pol J Vet Sci 2015, 18, 881-883.
- **Dudek K.**, Bednarek D., Szacawa E., Ayling R.D.: Screening of the *Cervidae* family in Poland for *Mycoplasma* species. J Vet Res 2016, 60, 399-402.

Profilaktyka zakażeń na tle *Mannheimia haemolytica* i wirusów układu oddechowego bydła

Obok zakażeń *M. bovis* ważną rolę w wieloczynnikowej etiologii BRD odgrywają również drobnoustroje z rodziny *Pasteurellaceae*, tj. *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, czy *Histophilus somni*, a także wirusy układu

oddechowego bydła (Cusack i wsp. 2003; Singh i wsp. 2011). Dlatego też badania nad immunoprofilaktyką tych zakażeń są niezwykle ważne w zapobieganiu chorobom okresu odchowu cieląt.

W profilaktyce zakażeń *M. haemolytica* stosowane są różnorodne szczepionki, jednak wydaje się, że te oparte o leukotoksoid bakterii są bardziej skuteczne w porównaniu do tych wykorzystujących całą komórkę lub inne czynniki wirulentne *M. haemolytica*.

W badaniach nad oceną skuteczności szczepionki opartej na leukotoksoidzie *M. haemolytica* wykorzystano cielęta, które podzielono na dwie grupy. Jedna z grup otrzymała w domięśniowej iniekcji komercyjną szczepionkę, a po upływie 3 tygodni cielętom obydwu grup podano dożylnie główny czynnik wirulentny *M. haemolytica* - leukotoksynę (LKT), która wykazuje cytotoksyczną aktywność w odniesieniu do leukocytów bydlęcych (Clinkenbeard i wsp., 1989). We krwi wszystkich cieląt oznaczono: ogólną liczbę leukocytów, leukogram, a także przeprowadzono analizę fenotypową leukocytów krwi obwodowej, tj. limfocyty T (CD2⁺), limfocyty Th (CD4⁺), limfocyty Ts/c (CD8⁺) oraz te wykazujące ekspresję cząstek adhezyjnych CD11b⁺ i CD18⁺. W odpowiedzi na iniekcję LKT wykazano spadek ogólnej liczby leukocytów, z wyraźną jednak przewagą dla cieląt nieszczepionych. Miało to odzwierciedlenie w liczbie neutrofilów, komórek średniej wielkości (monocyty, eozynofile i bazofile), limfocytów oraz odsetku komórek CD2⁺. W pierwszych godzinach po podaniu LKT obserwowano pewne podwyższenie odsetka limfocytów Th u cieląt szczepionych, z kolei odsetek komórek CD8⁺ uległ ogólnemu obniżeniu, jednak jego wartość była wyższa niż u cieląt nie poddanych szczepieniu. Podobnie kształtowały się zmiany komórek CD11b⁺, natomiast odsetek komórek CD18⁺ utrzymywał się na podwyższonym poziomie niemal przez całe doświadczenie u cieląt poddanych szczepieniu. Podanie szczepionki wywołało zatem wyraźną stymulację zarówno nieswoistych, jak i swoistych mechanizmów obronnych cieląt i chroniło je przed szkodliwym działaniem LKT *M. haemolytica*.

W praktyce hodowlanej najczęstszą formą immunizacji cieląt jest profilaktyka czynna, której pełną skuteczność mogą osłabiać różne czynniki, takie jak np. wysokie miano antagonizujących przeciwciał matczynych, stres czy infekcje. Immunizacja bierna, „poprzez matkę na cielę”, może zatem pełnić rolę wspomagającą w skutecznej profilaktyce chorób okresu odchowu cieląt. Dlatego też podjęto badania nad oceną skuteczności komercyjnej szczepionki zawierającej inaktywowane antygeny:

M. haemolytica, syncytialnego wirusa oddechowego bydła (BRSV) oraz wirusa parainfluenzy typu 3 (PI3V), podawanej ciężarnym krowom pod kątem jej wpływu na potomstwo za pośrednictwem transferu siary, tj. tej grupy wiekowej zwierząt, u której dotychczas nie była ona sprawdzana. Wyniki badań w pełni potwierdziły przyjęte założenia i wykazały skuteczny transfer odporności biernej na nowo narodzone cielęta od matek szczepionych, który przejawiał się m.in. podwyższeniem miana specyficznych przeciwciał anti-*M. haemolytica*, BRSV i PI3V w surowicy tych zwierząt, a także dodatkowo przeciwko ważnemu wirusowemu czynnikowi zakaźnemu bydła jakim jest herpesvirus bydlęcy typu 1 (BHV1). Szczepienie matek i transfer siary cielętom powodowało również u nich wzrost stężenia IgA, który dowodzi o wyraźnie stymulującym wpływie stosowanej szczepionki na MALT, która stanowi lokalną barierę ochronną przed kolonizacją i proliferacją bakterii chorobotwórczych. Korzystnym aspektem immunizacji ciężarnych krów była także stabilizacja odpowiedzi ostrej fazy u ich potomstwa zwykle nadmiernie pobudzanej w przebiegu infekcji. Zastosowanie szczepionki u krów ciężarnych wydaje się zatem skuteczną metodą zapobiegania chorobom u cieląt i jest godnym polecenia wymiernym działaniem profilaktycznym w przyszłej praktyce hodowlanej. Immunizacja matek ww. poliwalentną szczepionką, a następnie właściwy pasaż siary potomstwu istotnie poprawia u tych ostatnich swoiste mechanizmy odporności przeciwzakaźnej. Stosowanie immunizacji biernej w profilaktyce chorób okresu odchowu cieląt może ponadto wspomóc dotychczasowe bezpośrednie działanie profilaktyczne zalecane w okresie postnatalnym cieląt. Na podstawie ww. wyników opublikowano następujące prace:

- Bednarek D., **Dudek K.**, Urban-Chmiel R.: Odpowiedź immunologiczna cieląt immunizowanych szczepionką na wpływ leukotoksyny (LKT) *Mannheimia haemolytica* A1. *Lecznica dużych zwierząt* 2008, 9, 77-80.
- **Dudek K.**, Bednarek D., Ayling R.D., Szacawa E.: Stimulation and analysis of the immune response in calves from vaccinated pregnant cows. *Res Vet Sci* 2014, 97, 32-37.

Zakażenia mykoplazmowe u bydła oraz badania nad ich diagnostyką

Uczestniczyłam również w dalszych badaniach nad oceną prevalencji zakażeń *M. bovis* w krajowej populacji bydła, a także nad udziałem innych gatunków mykoplazm w zaburzeniach zdrowotnych u tego gatunku zwierząt. Drobnoustroje z rodzaju *Mycoplasma* takie jak *M. dispar*, *M. bovirhinis*, czy *M. canis* izolowane były bowiem z przypadków zapaleń płuc u bydła (Nicholas i Ayling 2003). W 2014 r. przebadano łącznie 89 surowic i wymazów z jamy nosowo-gardłowej pobranych od 23 cieląt oraz 66 krów mlecznych na terenie województwa lubelskiego. Dodatkowo badaniu poddano 54 próbki mleka. U 34 zwierząt obserwowano kliniczne objawy zapalenia płuc, gruczołu mlekowego lub stawów. Próbki surowic i mleka przebadano w kierunku obecności specyficznych przeciwciał anti-*M. bovis* komercyjnym zestawem ELISA. Wymazy z jamy nosowo-gardłowej oraz próbki mleka oceniano pod kątem obecności bakterii z rodzaju *Mycoplasma* badaniem hodowlanym oraz PCR/DGGE, z kolei obecność *M. bovis* wykrywano za pomocą antygenowego testu ELISA i gatunkowo specyficznego PCR. Obecność specyficznych przeciwciał anti-*M. bovis* notowano u 34 % badanych zwierząt. U 48 % cieląt wykazywało obecność antygenu *M. bovis*, natomiast u 57 % tej grupy wiekowej wykryto obecność DNA *M. bovis*. U krów wyniki tych badań były natomiast ujemne. Z kolei analiza wyników uzyskanych metodą PCR/DGGE u cieląt wykazała obecność DNA także innych gatunków mykoplazm, jak *M. bovirhinis* i *M. arginini*, a ich koinfekcja z *M. bovis* miała związek z występowaniem poważnych zaburzeń zdrowotnych u tych zwierząt. Ponadto u cieląt wykazano dodatnią korelację między występowaniem objawów klinicznych zakażenia, a wynikami metody PCR, a także między rezultatami badań serologicznych i hodowlanych. Z kolei u krów obserwowano dodatnią zależność między występowaniem objawów klinicznych infekcji, a wynikami badań serologicznych.

W latach 2014-2015 kontynuowano badania molekularne w zakresie występowania zakażeń mykoplazmowych i bakterii z rodzaju *Ureaplasma* i *Acholeplasma* (klasa *Mollicutes*) w krajowej populacji bydła. Łącznie przebadano 713 wymazów z jamy nosowo-gardłowej pobranych od bydła pochodzącego z 73 stad na terenie 9 województw kraju (6 regionów). Próbki przebadano następującymi metodami: hodowlaną, PCR, metodą RAPD (random amplification of polymorphic DNA) oraz PCR/DGGE. U 46 % badanych zwierząt obserwowano objawy kliniczne wskazujące na możliwość zakażenia *M. bovis*. Wyniki badań metodą PCR wykazały

natomiast obecność DNA *M. bovis* u 5,5 % badanych wymazów. Próbki z potwierdzoną obecnością DNA *M. bovis* poddano następnie sekwencjonowaniu, a otrzymane sekwencje nukleotydowe zamieszczono w międzynarodowej bazie NCBI GenBank. W przypadku 6 szczepów wykazano obecność mutacji punktowych w sekwencji nukleotydowej analizowanego fragmentu genu *uvrC*, a także różnice między sekwencjami aminokwasów w porównaniu do szczepu wzorcowego *M. bovis* PG45. Wyniki badań 20 szczepów *M. bovis* metodą RAPD wykazały natomiast występowanie dwóch oddzielnych grup I i II, do których zakwalifikowano odpowiednio 30 i 70 % badanych szczepów. Grupy te wykazywały niecałe 4 % podobieństwa. Z kolei metodą PCR/DGGE wyizolowano od 79 % badanych próbek DNA bakterii rodzaju *Mycoplasma* i *Ureaplasma*, tj. *M. bovirhinis*, *M. dispar*, *M. bovis*, *Ureaplasma diversum*, *M. canis*, *M. arginini*, *M. canadense*, *M. bovoculi* i *M. alkalescens*. W niemal 7 % przypadków obserwowano konifekcję *M. bovis* z innymi gatunkami mykoplazm i/lub *U. diversum*. W badanych próbkach nie wykryto natomiast obecności *M. bovigentialium*, *MmmSC* i *Acholeplasma laidlawii*. Wyniki prezentowanych badań po raz pierwszy w Polsce potwierdziły zmienność genotypową szczepów *M. bovis* izolowanych od bydła oraz dowiodły udziału innych niż *M. bovis* bakterii należących do klasy *Mollicutes* w zaburzeniach zdrowotnych u tego gatunku zwierząt.

W innych badaniach na ww. grupie 713 zwierząt dokonano po raz pierwszy w Polsce porównania skuteczności dostępnych metod stosowanych w diagnostyce zakażeń *M. bovis*, takich jak badanie hodowlane, PCR, serologiczny i antygenowy test ELISA oraz PCR/DGGE. Jak już wspomniano we wcześniejszych badaniach u 46 % badanych zwierząt wykazano objawy kliniczne mogące wskazywać na zakażenie *M. bovis*. Wyniki badań serologicznych wykazały jedynie 11 % zwierząt dodatnich, z kolei niemal u 7 % potwierdzono obecność *M. bovis* badaniem hodowlanym i antygenowym testem ELISA. Natomiast techniką PCR i PCR/DGGE udało się wykazać obecność DNA *M. bovis* w odpowiednio 9 % i niemal 6 % badanych próbek. Wyniki badań wykazały wysoki stopień korelacji dla wszystkich analizowanych metod, jednak najniższą porównywalność z innymi metodami notowano dla serologicznego testu ELISA. Najwyższy współczynnik korelacji notowano dla badania hodowlanego i PCR/DGGE, nieco niższy natomiast między pierwszą z metod, a techniką PCR. Wysoką korelację obserwowano również między metodą PCR, PCR/DGGE oraz antygenowym testem ELISA. Z kolei najwyższy współczynnik korelacji między występowaniem objawów klinicznych wskazujących na zakażenie *M. bovis*,

a stosowaną metodą diagnostyczną wykazano dla techniki PCR/DGGE. W następnej kolejności uplasowały się: antygenowy test ELISA, badanie hodowlane i PCR. Najniższy współczynnik korelacji obserwowano natomiast dla serologicznego testu ELISA. W badaniach tych nie wykazano jednak zależności między obserwowanymi objawami klinicznymi, a towarzyszącymi zakażeniom *M. bovis* koinfekcjami z udziałem innych drobnoustrojów klasy *Mollicutes*. Wyniki badań potwierdziły założenie, że skuteczna diagnostyka zakażeń na tle *M. bovis* u bydła powinna opierać się na łącznym stosowaniu metod serologicznych i molekularnych z dokładnym badaniem klinicznym zwierząt podejrzanych o zakażenie.

Z uwagi na możliwość wywoływania zaburzeń rozrodczych u bydła przez drobnoustroje klasy *Mollicutes*, takich jak np. *M. bovis*, *M. bovis genitalium* czy *U. diversum*, dokonano oceny ich udziału w przypadkach śmiertelności cieląt w okresie okołoporodowym (Byrne i wsp. 1999; Gale 1987; Ruhnke 1994; Wittkowski i wsp. 1984). Badania przeprowadzono na 121 martwo urodzonych cielętach pochodzących od 110 matek oraz 21 cielętach kontrolnych wywodzących się z 30 stad bydła. Surowicę krwi otrzymaną od łącznie 131 krów przebadano w kierunku obecności specyficznych przeciwciał anti-*M. bovis* komercyjnym testem ELISA. Z kolei próbki płuc i zawartości trawieńca cieląt oraz łożyska analizowano w kierunku obecności drobnoustrojów klasy *Mollicutes*, w tym *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. canadense*, *M. canis*, *M. arginini*, *M. bovirhinis*, *M. dispar*, *M. alkalescens* oraz *U. diversum* metodą PCR/DGGE. Wyniki badań serologicznych wykazały obecność specyficznych przeciwciał anti-*M. bovis* u 5 matek wywodzących się z 4 stad bydła, od których pochodziły martwo urodzone cielęta oraz u dwóch krów kontrolnych, które otrzymano z dwóch ww. stad. Z kolei wyniki badań molekularnych nie potwierdziły obecności DNA drobnoustrojów klasy *Mollicutes*, dlatego też nie zostały one uznane za przyczynę śmiertelności cieląt w okresie okołoporodowym, o którą w tym przypadku podejrzewa się *Neospora caninum* (Jawor i wsp. 2017). Na podstawie ww. wyników opublikowano następujące prace:

- Szacawa E., Niemczuk K., **Dudek K.**, Bednarek D., Rosales R., Ayling R: *Mycoplasma bovis* infections and co-infections with other *Mycoplasma* spp. with different clinical manifestations in affected cattle herds in eastern region of Poland. Bull Vet Inst Pulawy 2015, 59, 331-337.

- Szacawa E., Szymańska-Czerwińska M., Niemczuk K., **Dudek K.**, Woźniakowski G., Bednarek D.: Prevalence of pathogen from *Mollicutes* class in cattle affected by respiratory disease and molecular characteristics of *Mycoplasma bovis* field strains. J Vet Res 2016, 60, 391-397.
- Szacawa E., Szymańska-Czerwińska M., Niemczuk K., **Dudek K.**, Bednarek D., Ayling R.D.: Comparison of serological, molecular and cultural diagnostics methods for the detection of *Mycoplasma bovis* infections in cattle. Anim Sci Pap Rep 2016, 34, 351-359.
- Szacawa E., Jawor P., **Dudek K.**, Bednarek D., Stefaniak T.: Screening for *Mollicutes* microorganisms in perinatal calf mortality cases in Polish dairy herds. Pol J Vet Sci 2018, 21, 441-444.

Inne badania

We współpracy z Katedrą Epizootiologii i Kliniką Chorób Zakaźnych UP w Lublinie aktywnie uczestniczyłam w badaniach nad patomechanizmem **naturalnych zatruc zearalenonem** u owiec, mykotoksyną wywołującą objawy hiperestrogenizmu (Zinedine i wsp. 2007). W badaniach tych wykazano, że ważną rolę w patogenezie tego rodzaju zatruc odgrywają metabolity kaskady kwasu arachidonowego, tj. prostanoidy: PGF_{2α} oraz TXB₂.

W ramach aktywności naukowej Zakładu Chorób Bydła i Owiec PIWet-PIB uczestniczyłam w badaniach nad oceną skuteczności **terapii skojarzonej**, opartej na łączonym stosowaniu antybiotyku o przedłużonym działaniu i niesteroidowego leku przeciwzapalnego u cieląt z objawami BRD. Wyniki badań wykazały przewagę skuteczności stosowania terapii skojarzonej w porównaniu do podawania samego antybiotyku, co przejawiało się wyraźną poprawą stanu klinicznego chorych cieląt oraz normalizacją parametrów komórkowej odpowiedzi immunologicznej u tych zwierząt.

W Zakładzie Chorób Bydła i Owiec PIWet-PIB byłam również współwykonawcą badań w badaniach nad oceną wpływu stosowania **leku bodźcowego Biotropiny[®]** u cieląt na zmiany kształtowania się wybranych parametrów immunologicznych. Wyniki badań wykazały wyraźną stymulację mechanizmów zarówno komórkowej, jak i humoralnej odpowiedzi immunologicznej cieląt po

zastosowaniu Biotropiny[®], co ma wyraźne przełożenie na poprawę stanu ogólnej odporności przeciwwzakaźnej u tych zwierząt.

We współpracy z Zakładem Anatomii Patologicznej PIWet-PIB oraz Zakładem Chorób Wewnętrznych Zwierząt Gospodarskich i Koni UP w Lublinie aktywnie uczestniczyłam w badaniach nad oceną kształtowania się wybranych parametrów hematologicznych i biochemicznych w warunkach zakażenia jagniąt **wirusem JSRV (jaagsiekte sheep retrovirus)**, wywołującym gruczolakorak płuc u owiec (ovine pulmonary adenocarcinoma, OPA). Wyniki badań wykazały wyraźne zmiany w zakresie ocenianych parametrów, zwłaszcza w odniesieniu do liczby erytrocytów, koncentracji średniej masy hemoglobiny w erytrocycie i całkowitej hemoglobiny, a także zawartości jonów Na⁺ i Cl⁻ oraz wartości ciśnienia parcjalnego CO₂. Zmiany tych oraz pozostałych podlegających ocenie parametrów mogą być uważane zatem za zwiastunowe w odniesieniu do fazy klinicznej OPA.

We współpracy z Katedrą Epizootiologii i Kliniką Chorób Zakaźnych UP w Lublinie brałam także udział w badaniach dotyczących oceny kształtowania się zmian wybranych cytokin takich jak interleukina 2, 10 i transformujący czynnik wzrostu beta 1 oraz limfocytów T regulatorowych (Treg) **u psów ze zdiagnozowanymi nowotworami okołodbytowymi** o zróżnicowanym stopniu złośliwości i aktywności hormonalnej, które poddano terapii przeciwhormonalnej. W badaniach tych wykazano, że ww. parametry z powodzeniem mogą pełnić rolę pomocniczych markerów w prognozowaniu choroby oraz w ocenie różnicowania stopnia złośliwości tych nowotworów, a także efektywności ich terapii. Na podstawie ww. wyników opublikowano następujące prace:

- Kostro K., **Dudek K.**, Lisiecka U., Majer-Dziedzic B., Aleksiewicz R., Lutnicki K.: Concentrations of proinflammatory mediators of the arachidonic acid cascade in serum of sheep with natural zearalenone intoxication. Bull Vet Inst Pulawy 2012, 56, 75-81.
- Bednarek D., Lutnicki K., **Dudek K.**, Marczuk J., Kurek L., Mordak R., Stewart P.A.: The effect of the combined use of a long-acting antibiotic with NSAID on the clinical status and cellular immune response in calves affected with bovine respiratory disease. Cattle Pract, 2013, 21, 91-97.
- Bednarek D., **Dudek K.**, Szacawa E.: Biotropina – zastosowanie w immunopotencjalizacji odporności u cieląt. Lecznica dużych zwierząt. Monografia

„Immunoprofilaktyka swoista i nieswoista w zwalczaniu chorób bydła”. *Lecznica dużych zwierząt* 2014, 9, 57-64.

- **Dudek K.**, Lutnicki K., Bednarek D., Marczuk J., Kycko A., Reichert M.: Changes in blood parameters induced by experimental jaagsiekte sheep retrovirus infection. *J Vet Res* 2016, 60, 245-251.
- Lisiecka U., Kostro K., **Dudek K.**, Brodzki A., Czop M.: Evaluation of T regulatory lymphocytes and serum concentration of selected cytokines in dogs with perianal tumors. *Vet Immunol Immunop* 2019, 207, 10-17.

Piśmiennictwo

Alberti A., Addis M.F., Chessa B., Cubeddu T., Profiti M., Rosati S., Ruiu A., Pittau M.: Molecular and antigenic characterization of a *Mycoplasma bovis* strain causing an outbreak of infectious keratoconjunctivitis. *J Vet Diagn Invest* 2006, 18, 41-51.

Arcangioli M.A., Duet A., Meyer G., Dernburg A., Bézille P., Poumarat F., Le Grand D.: The role of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease outbreaks in veal calf feedlots. *Vet J* 2008, 177, 89-93.

Ayling R.D., Bashiruddin S.E., Nicholas R.A.: *Mycoplasma* species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. *Vet Rec* 2004, 155, 413-416.

Ayling R.D., Rosales R.S., Barden G., Gosney F.L.: Changes in antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from Great Britain. *Vet Rec* 2014, 175, 486.

Badolato R., Wang J.M., Murphy W.J., Lloyd A.R., Michiel, D.F., Bausserman, L.L., Kelvin D.J., Oppenheim J.J.: Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1994, 180, 203-209.

Baum S.G.: Introduction to mycoplasma diseases. W: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., red. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia, Pa, Elsevier Churchill Livingstone 2005, 2269-2271.

Bürki S., Gaschen V., Stoffel M.H., Stojiljkovic A., Frey J., Kuehni-Boghenbor K., Pilo P.: Invasion and persistence of *Mycoplasma bovis* in embryonic calf turbinate cells. *Vet Res* 2015, 46, 53.

Bye A., Lewis Y., O'Grady J.: Effect of a single oral dose of aspirin on the platelet aggregation response to arachidonic acid. *Br J Clin Pharmacol* 1979, 7, 283-286.

Byrne W.J., Brennan P., McCormack R., Ball H.J.: Isolation of *Mycoplasma bovis* from the abomasal contents of an aborted bovine fetus. *Vet Rec* 1999, 144, 211-212.

Caswell J.L., Bateman K.G., Cai H.Y., Castillo-Alcala F.: *Mycoplasma bovis* in respiratory disease of feedlot cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2010, 26, 365-379.

Clinkenbeard K.D., Mosier D.A., Confer A.W.: Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect Immun* 1989, 57, 420-425.

Cusack P.M.V., McMeniman, N., Lean, I.J.: The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. *Aust Vet J* 2003, 81, 480-487.

Dudek K., Bednarek D., Szymańska-Czerwińska M.: Acute phase response in calves as a result of experimental challenge with *Mycoplasma bovis*. *Bull Vet Inst Pulawy* 2010, 54, 517-520.

Dyer N., Hansen-Lardy L., Krogh D., Schaan L, Chamber E.: An outbreak of chronic pneumonia and polyarthritis syndrome caused by *Mycoplasma bovis* in feedlot bison (*Bison bison*). *J Vet Diagn Invest* 2008, 20, 369-371.

Estes D.M., Hirano A., Heussler V.T., Dobbelaere D.A.E., Brown W.C.: Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation *in vitro*. *Cell Immunol* 1995, 163, 268-279.

Farias M.V.N., Lendez P.A., Marin M., Quintana S., Martínez-Cuesta L., Ceriani M.C., Dolcini G. L.: Toll-like receptors, IFN- γ and IL-12 expression in bovine leukemia virus-infected animals with low or high proviral load. *Res Vet Sci* 2016, 107, 190-195.

Gale S.P.: The effects of two *Ureaplasma diversum* strains on early pregnancy in heifers. *Can J Vet Res* 1987, 51, 536-538.

Gautier-Bouchardon A.V., Ferré, S. Le Grand D., Paoli A., Gay E., Poumarat F.: Overall decrease in the susceptibility of *Mycoplasma bovis* to antimicrobials over the past 30 years in France. *PLoS One* 2014, 9, e87672.

Giovannini S., Zanoni M.G., Salogni C., Cinotti S., Alborali G.L.: *Mycoplasma bovis* infection in respiratory disease of dairy calves less than one month old. *Res Vet Sci* 2013, 95, 576-579.

Gruys E., Obwolo M.J., Toussaint M.J.M.: Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Vet Bull* 1994, 64, 1009-1018.

Gruys E., Toussaint M.J., Niewold T.A., Koopmans S.J.: Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005, 6, 1045-1056.

Heinrich P.C., Castell J.V., Andus T.: Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990, 265, 621-636.

Hermeyer K., Buchenau I., Thomasmeyer A., Baum B., Spargser J., Rosengarten R., Hewicker-Trautwein M.: Chronic pneumonia in calves after experimental infection with *Mycoplasma bovis* strain 1067: Characterization of lung pathology, persistence of variable surface protein antigens and local immune response. *Acta Vet Scand* 2012, 54, 9.

Houghton S.B., Gourlay R.N.: Synergism between *Mycoplasma bovis* and *Pasteurella haemolytica* in calf pneumonia. *Vet Rec* 1983, 113, 41-42.

Howard C.J., Gourlay R.N.: Immune response of calves following the inoculation of *Mycoplasma dispar* and *Mycoplasma bovis*. *Vet Microbiol* 1983, 8, 45-56.

Janardhan K.S., Hays M., Dyer N., Oberst R.D., Debey B.M.: *Mycoplasma bovis* outbreak in a herd of North American bison (*Bison bison*). *J Vet Diagn Invest* 2010, 22, 797-801.

Jawor P., Król D., Mee J.F., Sołtysiak Z., Dzimira S., Larska M., Stefaniak T.: Infection exposure, detection and causes of death in perinatal mortalities in Polish dairy herds. *Theriogenology* 2017, 103, 130-136.

Jungi T.W., Krampe M., Sileghem M., Griot C., Nicolet J.: Differential and strain-specific triggering of bovine alveolar macrophage effector functions by mycoplasmas. *Microb Pathog* 1996, 21, 487-498.

Kleinschmidt S., Spargser J., Rosengarten R., Hewicker-Trautwein M.: Long-term survival of *Mycoplasma bovis* in necrotic lesions and in phagocytic cells as demonstrated by transmission and immunogold electron microscopy in lung tissue from experimentally infected calves. *Vet Microbiol* 2013, 162, 949-953.

Knolle P., Löhr H., Treichel U., Dienes H.P., Lohse A., Schlaack J., Gerken G.: Parenchymal and nonparenchymal liver cells and their interaction in the local immune response. *Z Gastroenterol* 1995, 33, 613-620.

Krzymowski T., Przała J.: Fizjologia zwierząt. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 2005.

Le G.D., Calavas D., Brank M., Citti C., Rosengarten R., Bézille P., Poumarat F.: Serological prevalence of *Mycoplasma bovis* infection in suckling beef cattle in France. *Vet Rec* 2002, 150, 268-273.

- Linke R.P.**, Bock V., Valet G., Rothe G.: Inhibition of the oxidative burst response of N-formyl peptide-stimulated neutrophils by serum amyloid-A protein. *Biochem. Biophys Res Commun* 1991, 176, 1100-1105.
- Maeda T.**, Shibahara T., Kimura K., Wada Y., Sato K., Imada Y., Ishikawa Y., Kadota K.: *Mycoplasma bovis*-associated suppurative otitis media and pneumonia in bull calves. *J Comp Pathol* 2003, 129, 100-110.
- Mah T.F.**, O'Toole G.A.: Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001, 9, 34-39.
- Maunsell F.P.**, Donovan G.A., Risco C., Brown M.B.: Field evaluation of a *Mycoplasma bovis* bacterin in young dairy calves. *Vaccine* 2009, 27, 2781-2788.
- McAuliffe L.**, Ellis R.J., Miles K., Ayling R.D., Nicholas R.A.: Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology* 2006, 152, 913-922.
- Mulongo M.**, Prysliak T., Perez-Casal J.: Vaccination of feedlot cattle with extracts and membrane fractions from two *Mycoplasma bovis* isolates results in strong humoral immune responses but does not protect against an experimental challenge. *Vaccine* 2013, 31, 1406-1412.
- Murata H.**, Shimada N., Yoshioka M.: Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J* 2004, 168, 28-40.
- Nicholas R.A.J.**, Ayling R.D., Stipkovits L.P.: An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*: clinical, cultural, serological and pathological findings. *Vaccine* 2002, 20, 3569-3575.
- Nicholas R.A.J.**, Ayling R.D.: *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis and control. *Res Vet Sci* 2003, 74, 105-112.
- Nicholas R.A.J.**, Rosales R.S., Loria G.R.: Mycoplasmaology: the big issues. *Anim Husbandry Dairy Vet Sci* 2017, 1, 1-4.
- O'garra A.**, Vieira P.: Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 2004, 10, 801-805.
- Oh S.K.**, Pavlotsky N., Tauber A.I.: Specific binding of haptoglobin to human neutrophils and its functional consequences *J Leukoc Biol* 1990, 47, 142-148.
- OIE Terrestrial Manual Contagious agalactia** 2018. Chapter 2.7.4. Contagious agalactia (NB: Version adopted in May 2018), version online.

OIE Terrestrial Manual Contagious bovine pleuropneumonia 2018. Chapter 2.4.8. Contagious bovine pleuropneumonia (infection with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC) (NB: Version adopted in May 2014), version online.

Petersen H.H., Nielsen J.P., Heegaard P.M.: Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* 2004, 35, 163-187.

Puleio R., Loria G.R., Nicholas R.A.J.: Mycoplasmas in the brains of animals: An overlooked site of infection. *International Journal of Veterinary and Dairy Sciences* 2017, 1-5.

Qi J., Guo A., Cui P., Chen Y., Mustafa R., Ba X. Hu C., Bai Z., Chen X., Shi L., Chen H.: Comparative geno-plasticity analysis of *Mycoplasma bovis* HB0801 (Chinese isolate). *PLoS One* 2012, 7, e38239.

Radaelli E., Luini M., Loria G.R., Nicholas R.A., Scanziani E.: Bacteriological, serological, pathological and immunohistochemical studies of *Mycoplasma bovis* respiratory infection in veal calves and adult cattle at slaughter. *Res Vet Sci* 2008, 85, 282-290.

Razin S., Jacobs E.: Mycoplasma adhesion. *J. Gen. Microbiol.*, 1992, 138, 407-422.

Razin S., Yogev D., Naot Y.: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998, 62, 1094-1156.

Register K.B., Woodbury M.R., Davies J.L., Trujillo J.D., Perez-Casal J., Burrage P.H., **Clark** E.G., Windeyer M.C.: Systemic mycoplasmosis with dystocia and abortion in a North American bison (*Bison bison*) herd. *J Vet Diagn Invest* 2013, 25, 541-545.

Rosenbusch R.: Test of an inactivated vaccine against *Mycoplasma bovis* respiratory disease by transthoracic challenge with an abscessing strain. Abstracts of the 12th International Organisation of Mycoplasma Conference, Sydney, Australia, 22-28 July 1998, p. 185.

Ruhnke H.L.: Mycoplasmas associated with bovine genital tract infections. In: Whitford H.W., Rosenbusch R.F., Lauerma L.H. (eds) *Mycoplasmosis in Animals. Laboratory Diagnosis*. Iowa State University Press, Ames, Iowa 1994, pp. 56-61.

Saraiva M., O'Garra A.: The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010, 10, 170-181.

Schindler R., Mancilla J., Endres S., Ghorbani R., Clark S.C., Dinarello C.A.: Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 1990, 75, 40-47.

- Singh** K., Confer A.W., Hope J.C., Rizzi T., Wyckoff J.H., 3rd, Weng H.Y., et al.: Cytotoxicity and cytokine production by bovine alveolar macrophages challenged with wild type and leukotoxin-deficient *Mannheimia haemolytica*. *Vet J* 2011, 188, 221-227.
- Siwicki** A.K., Pejsak Z., Studnicka M., Klein P., Mokrzycka A., Rymuszka A., Bownik A.: Badania porównawcze nad wpływem dimeru lizozymu (KLP-602, Lydium-KLP) na komórkowe i humoralne mechanizmy obronne oraz poziom cytokin u prosiąt. (A comparative study on the effect of lysozyme dimer (KLP602, Lydium-KLP) on cellular and humoral defence mechanisms and cytokine levels in piglets). *Materiały II Krajowego Sympozjum Immunologów Wet.* (Proceedings of the II National Symposium on Veterinary Immunology), Świnoujście, 1997, p. 175.
- Soehnlen** M.K., Aydin A., Lengerich E.J., Houser B.A., Fenton G.D., Lysczek H.R., Burns C.M., Byler L.I., Hattel A.L., Wolfgang D.R., Jayarao B.M.: Blinded, controlled field trial of two commercially available *Mycoplasma bovis* bacterin vaccines in veal calves. *Vaccine* 2011, 29, 5347-5354.
- Stefaniak** T.: Białka ostrej fazy u bydła. W: Białka ostrej fazy u zwierząt, red. Kostro K., Gliński Z., Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Lublinie, Lublin, 2003, 174-176.
- Sulyok** K.M., Kreizinger Z., Fekete L., Hrivnák V., Magyar T., Jánosi S., Schweitzer N., Turcsányi I., Makrai L., Erdélyi K., Gyuranecz M.: Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* strains isolated from cattle in Hungary, Central Europe. *BMC Vet Res* 2014, 10, 256.
- Tenk** M., Stipkovits L., Hufnagel L.: Examination of the role of *Mycoplasma bovis* in bovine pneumonia and a mathematical model for its evaluation. *Acta Vet Hung* 2004, 52, 445-456.
- Thomas** C.B., Van Ess P., Wolfgram L.J., Riebe J., Sharp P., Schultz R.D.: Adherence to bovine neutrophils and suppression of neutrophil chemiluminescence by *Mycoplasma bovis*. *Vet Immunol Immunopathol* 1991, 27, 365-381.
- Toussaint** M.J.M., van Ederen A.M., Gruys E.: Implication of clinical pathology in assessment of animal health and in animal production and meat inspection. *Comp Haematol Int* 1995, 5, 149-157.
- Traczyk** W.Z., Trzebski A.: Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001.
- Tschopp** R., Bonnemain P., Nicolet J., Burnens A.: Epidemiological study of risk factors for *Mycoplasma bovis* infections in fattening calves. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2001, 143, 461-467.

Underdown B.J., Schiff J.M.: Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu Rev Immunol* 1986, 4, 389-417.

van der Merwe J., Prysliak T., Perez-Casal J.: Invasion of bovine peripheral blood mononuclear cells and erythrocytes by *Mycoplasma bovis*. *Infect Immun* 2010, 78, 4570-4578.

van Miert A.S.: Pro-inflammatory cytokines in a ruminant model: pathophysiological, pharmacological, and therapeutic aspects. *Vet Q* 1995, 17, 41-50.

Vanden Bush T.J., Rosenbusch R.F.: Characterization of a lympho-inhibitory peptide produced by *Mycoplasma bovis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 315, 336-341.

Vanden Bush T.J., Rosenbusch R.F.: Characterization of the immune response to *Mycoplasma bovis* lung infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2003, 94, 23-33.

Vanden Bush T.J., Rosenbusch R.F.: *Mycoplasma bovis* induces apoptosis of bovine lymphocytes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002, 32, 97-103.

Wawegama N.K., Markham P.F., Kanci A., Schibrowski M., Oswin S., Barnes T.S., Firestone S.M., Mahony T.J., Browning G.F.: Evaluation of an IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay as a Serological Assay for Detection of *Mycoplasma bovis* Infection in Feedlot Cattle. *J Clin Microbiol* 2016, 54, 1269-1275.

Welsh R.D., Dye L.B., Payton M.E., Confer A.W.: Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia: 1994-2002. *J Vet Diagn Invest* 2004, 16, 426-431.

Wittkowski G., Roth B., Kirchhoff H.: Demonstration of mycoplasmas and ureaplasmas in the bovine genital tract. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1984, 97, 189-190, 193-197.

Xue W., Ellis J., Mattick D., Smith L., Brady R., Trigo E.: Immunogenicity of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhoea virus types 1 and 2, infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus when administered intranasally in young calves. *Vaccine* 2010, 28, 3784-3792.

Zhang R., Han X., Chen Y., Mustafa R., Qi J., Chen X., Hu C., Chen H., Guo A. Attenuated *Mycoplasma bovis* strains provide protection against virulent infection in calves. *Vaccine* 2014, 32, 3107-3114.

Zinedine A., Soriano J.M., Moltó J.C., Mañes J.: Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem Toxicol* 2007, 45, 1-18.

6. Podsumowanie dorobku naukowego (szczegółowy wykaz prac naukowych oraz informacji o osiągnięciach dydaktycznych, wykonanych recenzjach, współpracy naukowej i popularyzacji nauki znajduje się w załączniku nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego).

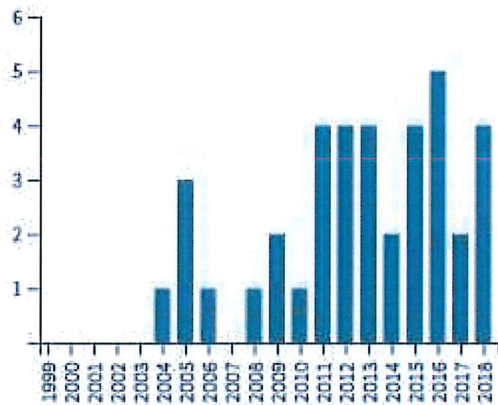
Zestawienie publikacji naukowych:

Liczba publikacji w czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR)	44
a. w tym opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora	8
b. w tym opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora	36
c. w tym stanowiących osiągnięcie naukowe	10
d. w tym publikacje oryginalne	40
Liczba publikacji w czasopismach spoza listy JCR	18
Liczba rozdziałów w monografiach	19
Liczba rozdziałów w książkach	1
Łączna liczba publikacji	82
Liczba komunikatów konferencyjnych	32
Sumaryczny IF	27,007
a. w tym dla publikacji przed uzyskaniem stopnia doktora	2,582
b. w tym dla publikacji po uzyskaniu stopnia doktora	24,425
c. w tym dla publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe	10,143
Suma punktów MNiSW	757
a. w tym dla publikacji przed uzyskaniem stopnia doktora	60
b. w tym dla publikacji po uzyskaniu stopnia doktora	697
c. w tym dla publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe	220
Liczba cytowań według bazy Web of Science Core Collection	164
a. w tym bez autocytowań	85
Indeks Hirscha według bazy Web of Science Core Collection	7

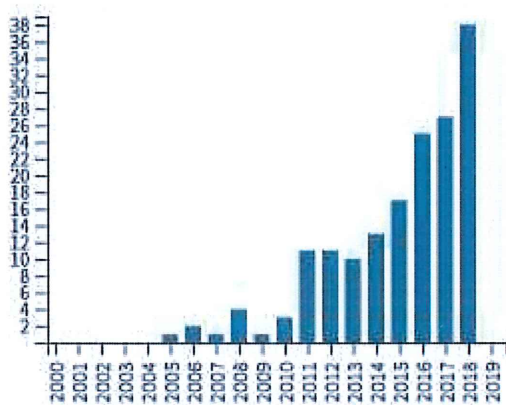
Zestawienie liczby publikacji w poszczególnych czasopismach z listy JCR:

Czasopismo	Liczba publikacji (w tym jako pierwszy autor)
Bulletin of the Veterinary Research Institute in Pulawy / Journal of Veterinary Research	19 (12)
Medycyna Weterynaryjna	7 (5)
Polish Journal of Veterinary Sciences	5 (3)
Polish Journal of Environmental Studies	3 (1)
Acta Veterinaria Hungarica	2 (2)
Animal Science Papers and Reports	1
Annals of Agricultural and Environmental Medicine	1
Cattle Practice	1
Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics	1
Research in Veterinary Science	1 (1)
Vaccine	1 (1)
Veterinary Immunology and Immunopathology	1
Veterinary Record	1
Łączna liczba publikacji (w tym jako pierwszy autor)	44 (25)

**Liczba publikacji w poszczególnych latach według Web of Science Core Collection
(2019.01.25):**



**Liczba cytacji w poszczególnych latach według Web of Science Core Collection
(2019.01.25):**



Puławy, 2019.01.29