

AUTOREFERAT

Dr n. wet. Magdalena Larska

Zakład Wirusologii

Państwowy Instytut Weterynaryjny

– Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

Puławy, 2013

1. Imię i nazwisko: Magdalena Larska**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe (nazwa, miejsce i rok ich uzyskania):**

- 2.1. **Lekarz weterynarii**, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, 2001;
- 2.2. **Doktor nauk weterynaryjnych**, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy (PIWet-PIB) w Puławach, 2006, tytuł rozprawy doktorskiej: „**Diagnostyka i pokrewieństwo filogenetyczne szczepów wirusa zapalenia tętnic koni**” (realizacja 2004-2006).

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- 3.1. 2001 - 2004 r. – Zakład Wirusologii, PIWet-PIB, na techniczno-inżynierskim stanowisku **lekarza weterynarii**;
- 3.2. 2004 - 2006 r. – Zakład Wirusologii, PIWet-PIB, na stanowisku **asystenta**;
- 3.3. Od 2006 r. - Zakład Wirusologii, PIWet-PIB, na stanowisku **adiunkta**;
- 3.4. **Staże zagraniczne:**
 - 3.4.1. 2007 - 2008 r. - 11-miesięczny staż w **Weterynaryjnym Instytucie Naukowym Duńskiego Uniwersytetu Technicznego (DTU-Vet) na wyspie Lindholm, Dania**;
 - 3.4.2. 2008 r. – miesięczny staż w **Centralnym Weterynaryjnym Laboratorium Naukowym w Dubaju, Zjednoczone Emiraty Arabskie**;
 - 3.4.3. 2008 r. - 6-miesięczne stypendium NeuroPrion na realizację badań w **Laboratorium Biologii Molekularnej i Komórkowej Prionów, Państwowego Instytutu Naukowo-Technicznego ds. Rolnictwa i Żywności, Centrum Naukowego Zdrowia Zwierząt (CISA-INIA) w Valdeolmos, Madryt, Hiszpania**;
 - 3.4.4. 2010 - 2011 r. - dwuletni staż w **Katedrze Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Szwedzkiego Uniwersytetu Nauk Rolniczych (SLU) oraz w instytucie SVA w Uppsali, Szwecja**.

4. Osiągnięcia habilitacyjne wynikające 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. Nr 65, poz. 595 ze zm.):

4.1. **Jednotematyczny cykl publikacji** pod wspólnym tytułem:**ZAKAŻENIA PESTIWIRUSOWE BYDŁA**4.2. **Lista publikacji** składająca się na cykl (impact factor - IF według Thomson Reuters Journal Citation Reports 2012; punkty MNiSW z 2012 r.; udział własny)

Nr	Artykuł	IF	Punkty MNiSW
I.	Kuta A., Polak M.P., Larska M. , Żmudziński, J.F.: Predominance of bovine viral diarrhoea virus 1b and 1d subtypes during eight years of survey in Poland. <i>Veterinary Microbiology</i> 2013 [opublikowane online: http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.vetmic.2013.07.002]	3,127	40
Udział własny: koncepcja badań, analiza filogenetyczna, przygotowanie publikacji i jej korekta – 40%			
II.	Kuta A., Polak M.P., Larska M. , Żmudziński J.F.: Monitoring of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in Polish dairy herds using bulk milk samples. <i>Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy</i> 2013, 57, 149-156.	0,377	20
Udział własny: współudział w opracowaniu koncepcji, celu i metodyki badań, analiza statystyczna wyników oraz ich prezentacja graficzna, edycja i korekta tekstu – 50%			
III.	Larska M. , Polak M.P., Liu L., Alenius S., Uttenthal Å.: Comparison of the performance of five different immunoassays to detect specific antibodies against emerging atypical bovine pestivirus (2013) <i>Journal of Virological Methods</i> , 187, 103-109.	2,065	25
Udział własny: koncepcja badań, przeprowadzenie badań w laboratorium (ELISA i test neutralizacji wirusa), analiza statystyczna wyników badań, przygotowanie rycin, napisanie publikacji i jej korekta po recenzji - 80%			
IV.	Larska M. , Polak M.P., Riitho V., Strong R., Belák S., Alenius S., Uttenthal, Å., Liu, L.: Kinetics of single and dual infection of calves with an Asian atypical bovine pestivirus and a highly virulent strain of bovine viral diarrhoea virus 1 (2012) <i>Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases</i> , 35, 381-390	2,225	30
Udział własny: współudział w opracowywaniu planu i celu badań, przeprowadzenie zakażenia eksperymentalnego na cielętach, badania real-time RT-PCR, koordynacja badań laboratoryjnych, analiza statystyczna wyników badań, przygotowanie rycin, napisanie publikacji - 80%			
V.	Kuta A., Larska M. , Polak M.P., Żmudziński J.F.: Atypowe pestiwirusy - Ryzyko dla hodowli bydła i znaczenie dla kontroli wirusowej biegunki bydła i choroby błon śluzowych (BVD-MD). <i>Medycyna Weterynaryjna</i> 2012, 68, 84-87	-	10
Udział własny: współtworzenie publikacji, opracowanie rycin – 40%			
VI.	Larska M. , Polak M.P.: Zastosowanie real time RT-PCR do wykrywania wirusa biegunki bydła i choroby błon śluzowych (BVD-MD) typu 1 i typu 3 w materiale biologicznym. <i>Medycyna Weterynaryjna</i> 2011, 67, 483-487	-	10
Udział własny: opracowanie koncepcji, celu i metod badań, przeprowadzenie badań laboratoryjnych w zakresie real-time RT-PCR, opracowanie standardów RNA, w tym klonowanie i transkrypcja <i>in vitro</i> , analiza wyników, opracowanie tekstu i rycin – 90%			
Razem		7,79	135

4.3. **Omówienie celu naukowego ww. prac, osiągniętych wyników, znaczenia przeprowadzonych badań i oryginalnego wkładu w rozwój dziedziny nauki**

Zakażenia pestiwirusami są powszechne w pogłowie bydła na całym świecie i w Polsce. Prowadzą one do znacznych strat ekonomicznych dla hodowców i mogą prowadzić do spadku produktywności zwierząt oraz ograniczeń w przemieszczaniu i handlu zwierzętami. U bydła najczęściej dochodzi do zakażeń jednym z dwóch gatunków pestiwirusa wywołującego tzw. wirusową biegunkę bydła i chorobę błon śluzowych (BVDV-1 i BVDV-2). Pestiwirusy to małe, posiadające otoczkę wirusy, z genomem zbudowanym z jednoniciowego RNA o dodatniej polarności. Oprócz bydła na zakażenie BVDV wrażliwe są również małe i dzikie przeżuwacze, wielbłądowate i świniowate, co szczególnie u tych ostatnich może utrudnić diagnozowanie klasycznego pomoru świń (CSF - wirus CSFV powodujący to schorzenie jest blisko spokrewniony z BVDV). Wirusy z rodziny *Flaviviridae*, do której należy BVDV charakteryzują się dużą zmiennością genetyczną. Do rodziny tej należą również m. in. takie wirusy jak wspomniany już CSFV, ale również wirusy choroby granicznej (BDV) i atypowe pestiwirusy bydlęce, proponowane jako trzeci gatunek BVDV. Ze względu na pokrewieństwo BVDV do innego flawiwirusa, wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV), wirus bydlęcy jest wykorzystywany jako model zastępczy do badania molekularnych mechanizmów patogenezы, poszukiwania markerów zakażenia i możliwości leczenia zakażeń HCV. Zakażenia wirusem BVD-MD u przeżuwaczy są powszechnie na wszystkich kontynentach. Jedynie krajom skandynawskim i Austrii udało się uwolnić populacje bydła od zakażenia tym wirusem. Rezerwuarem BVDV są zwierzęta zakażone trwale (PI – persistently infected), które zakażone w życiu płodowym przed uzyskaniem immunokompetencji, po urodzeniu wydalają go przez całe życie w znaczących ilościach we wszystkich wydalinach i wydzielinach. Ostatnio coraz częściej zwraca się uwagę na problem zakażeń ostrych, w których pomimo krótkotrwałej wirerii, zakończonej serokowersją dochodzi do siewstwa wirusa, które w przypadku nasienia buhajów może trwać nawet kilka miesięcy. Stwierdzany najczęściej w przypadku zakażenia wirusem BVD-MD subkliniczny przebieg choroby dodatkowo utrudnia prawidłową diagnostykę. Wcześniejsze badania serologiczne wykazały nawet 80% prewalencję tego wirusa w stadach bydła mlecznego w kraju, a odsetek zwierząt PI sięgał 2%. Kontrola zakażeń BVDV polega zatem głównie na zapobieganiu infekcjom płodu i usuwaniu zwierząt PI. Ze względu na powszechność występowania zakażeń BVDV u bydła poważnym problemem jest kontaminacja produktów biologicznych takich jak płodowe surowice bydlęce stosowane w diagnostyce wirusologicznej, szczepionki stosowane w immunoprofilaktyce chorób zakaźnych, czy inne produkty pochodzenia bydlęcego tj. hormony czy produkty mleczne. Kontaminacja szczepionek przeciw IBR-IPV doprowadziła w 2001 r. do transmisji patogennych szczepów BVDV-2 występujących dotychczas w Ameryce Płn. do Holandii, a następnie do wielu innych

krajów europejskich. W 2008 r. BVDV-2 wyizolowany został na Słowacji. W 2004 r. naukowcy z Friedrich-Loeffler-Institut w Niemczech zidentyfikowali w płodowej surowicy bydłej z Brazylii nowego pestiwirusa nazwanego HoBi. Następnie grupa naukowców ze Szwecji pod kierownictwem prof. Stefana Aleniusa odkryła podobnego wirusa u cielęcia z Tajlandii. Obecnie patogeny te określane są jako atypowe wirusy bydłce, a z powodu ich bliskiego pokrewieństwa do BVDV-1 i BVDV-2 proponowane jako nowy gatunek - BVDV-3. Jeszcze do niedawna rozprzestrzenienie tych wirusów ograniczało się do Ameryki Południowej i Azji, jednak w ostatnich dwóch latach transmisję tego gatunku pestiwirusa związaną z upadkami u cieląt i poronieniami u krów stwierdzono w stadach bydła mlecznego we Włoszech. BVDV-3 stanowi wyzwanie diagnostyczne, ponieważ jego odmienność od znanych BVDV utrudnia wykrywanie zakażeń tym wirusem. Pierwsze izolacje BVDV-3 dotyczyły jedynie produktów pochodzących od bydła, nie znane były przebieg i obraz kliniczny zakażenia. Atypowe pestiwirusy są również wyzwaniem w programach kontroli zakażeń opartych na stosowaniu immunoprofilaktyki, ponieważ brak dostępnych szczepionek do zwalczania zakażeń BVDV-3. Ze względu na globalizację handlu i przemieszczania międzynarodowego zwierząt hodowlanych oraz nasienia buhajów, intensyfikację produkcji bydłej i zwiększenie zagęszczenia i wielkości stad oraz stosowanie szczepień (zawierających szczególnie żywe lub atenuowane wirusy) istnieje również realna szansa wprowadzenia BVDV-3 do Polski, co może mieć katastrofalne konsekwencje dla przygotowywanych obecnie w kraju programów zwalczania tych zakażeń.

Prezentowany cykl publikacji jest szerokim i kompleksowym opracowaniem zagadnień związanych z patogenezą, diagnostyką i zwalczaniem zakażeń BVDV w populacji bydła w Polsce, które dało podstawę do opracowania programu eradykacji tego wirusa w hodowli bydła w kraju. Jednocześnie jest to jedyne takie opracowanie problemu zakażeń BVDV w Polsce.

Do głównych celów prowadzonych badań zaliczyć można:

- ✓ Charakterystyka molekularna wirusów biegunki bydła (BVDV) krążących w Polsce (Artykuł I).
- ✓ Określenie statusu epizootycznego BVD stad bydła mlecznego na podstawie badania próbek mleka zbiorczego (Artykuł II).
- ✓ Porównanie przebiegu zakażeń BVDV-1 i atypowym pestiwirusem bydłcem (Artykuł IV).
- ✓ Problemy diagnostyczne zakażeń atypowym pestiwirusem (Artykuły III, V, VI).

Charakterystyka molekularna wirusów biegunki bydła (BVDV) krążących w Polsce

Zróżnicowanie genetyczne BVDV w Polsce określono na podstawie badań wybranych 65 wirusów wyizolowanych w latach 2004-2011 z 28 stad bydła. PI pochodziły z dwunastu województw, gdzie zlokalizowane jest ponad 90% populacji bydła w kraju. Analizę filogenetyczną oparto na dwóch fragmentach genomu wirusa: 5'-UTR i Npro. Wszystkie izolaty BVDV należały do jednej z czterech podgrup gatunku BVDV-1. Ponad 47% wirusów scharakteryzowano jako BVDV-1b, który był obecny w 12 stadach, a prawie 40% izolatów z 9 stad należało do podgrupy BVDV-1d. Reszta wirusów sklasyfikowana została jako BVDV-1f (12%) i BVDV-1g (3%). W większości stad dominował tylko jeden szczep wirusowy. Pomimo intensyfikacji produkcji i wolnego handlu wewnątrz wspólnotowego zmienność polskich BVDV jest niewielka, co może ułatwić diagnostykę i kontrolę zakażeń. Jednocześnie skuteczność szczepionek przeciw temu patogenowi może być gorsza, ponieważ wszystkie obecnie produkowane są na BVDV-1a, którego w Polsce nie stwierdzano. Dodatkowo w przypadku transmisji BVDV-2 lub BVDV-3 może dojść do dużych strat w hodowli, ze względu na różnice antygenowe tych wirusów w stosunku od krążących w kraju oraz wykorzystywanych w dostępnych szczepionkach. Realne ryzyko wprowadzenia na przykład BVDV-3 istnieje, gdyż kontaminację tymi patogenami płodowych surowic bydłowych dostępnych w Polsce opisaliśmy wcześniej (artykuł VI). Dlatego też jednym z ważniejszych osiągnięć unikalnym w skali kraju było opracowanie metod skutecznej diagnostyki zakażeń BVDV i identyfikacji nowych pestiwirusów. Moje badania w tym zakresie doprowadziły do wdrożenia wydajnych i wiarygodnych technik diagnostycznych umożliwiających nie tylko stwierdzenie obecności wirusa w stadzie bydła, ale także jego typowanie, co jest niezwykle ważne dla rozwiązań przyjętych w programie zwalczania BVDV i zaakceptowanych przez Głównego Lekarza Weterynarii. Dalsze badania dotyczące możliwości transmisji BVDV-3 do Polski są przedmiotem niedawno uzyskanego grantu (pkt 7.1).

Określenie statusu epizootycznego BVD stad bydła mlecznego poprzez badanie próbek mleka zbiorczego

Programy zwalczania BVDV opierają się na identyfikacji zwierząt PI, które są rezerwuarem wirusa w stadzie i ich eliminacji. W kolejnych etapach uwalniania stada konieczne jest stosowanie zasad bioasekuracji lub wprowadzenie szczepień. Programy powinny być projektowane indywidualnie w zależności od struktury i statusu epizootycznego stada oraz od możliwości i chęci współpracy hodowców. Uwalnianie stad bydła od BVDV jest procesem długotrwałym i kosztownym, jednakże niezbędnym, jeśli w Polska chce być pełnoprawnym uczestnikiem handlu wewnątrz wspólnotowego. Ciekawą alternatywą dla stad nie szczepionych

jest skrining serologiczny na poziomie stada polegający na badaniach odpowiednimi testami serologicznymi typu ELISA próbek mleka tankowego (zbiorczego, BTM). Badania BTM były podstawą zwalczania BVDV w krajach skandynawskich, co doprowadziło do skutecznego uwolnienia tych krajów jako pierwszych na świecie od zakażeń bydłęcymi pestiwirusami. Badania BTM należy traktować jako pomocnicze, jednak ich skuteczność jest duża, o czym przekonaliśmy się po wprowadzeniu takiego rozwiązania w blisko stu stadach bydła mlecznego uczestniczących w pilotażowym programie zwalczania BVDV opracowywanym w Zakładzie Wirusologii PIWet-PIB przy wydatnym moim udziale. Wyniki tych badań przedstawiono w artykule II. Obecność zakażeń BVDV stwierdzono w 70% stad, zatem powaga problemu jest duża. Na podstawie badań BTM stada zaliczono do czterech klas według kategoryzacji szwedzkiej. Wszystkie stada, w których zidentyfikowano PI należały do czwartej klasy. Po eliminacji PI obserwowano powolny spadek miana przeciwciał w BTM, który zależnie od stada wahał się pomiędzy 5 a 30 mies. Odpowiednia analiza badań serologicznych BTM przedstawia duże perspektywy dla programu zwalczania zakażeń BVDV w Polsce. Obecnie kontynuujemy badania BTM w celu oceny wszystkich dostępnych do tego zestawów ELISA oraz przygotowania próbek wzorcowych mleka dla laboratoriów regionalnych. Testy te zostaną włączone w krajowy program zwalczania BVDV również w laboratoriach ZHW.

Porównanie przebiegu zakażeń BVDV-1 i atypowym pestiwirusem bydłęcym

Celem zakażenia eksperymentalnego opisanego szczegółowo w artykule IV było określenie patogenności atypowego pestiwirusa bydłęcego dla 3-5 miesięcznych wolnych od zakażenia i przeciwciał BVDV cieląt pochodzących z polskiej hodowli. Do zakażenia wykorzystano nowy atypowy pestiwirus Th/04_KhonKaen wykryty u cielęcia z Tajlandii, wyosobniony z inaktywowanej surowicy bydłęcej przez elektroporację wirusowego RNA do hodowli komórek małżowiny bydłęcej BT i propagację żywego wirusa. Jedna grupa cieląt została zakażona wysoce patogennym terenowym szczepem BVDV-1 w celu porównania z właściwościami patogennymi atypowego pestiwirusa. Dodatkowo kolejnej grupie podano oba wirusy w tych samych dawkach. We wszystkich zakażonych grupach w odróżnieniu od nie zakażonej grupy kontrolnej obserwowano podobny przebieg infekcji z wiremią skorelowaną z umiarkowaną gorączką, osłabieniem i leukocytopenią. U cieląt zakażonych BVDV-1 wystąpiła dodatkowo krótkotrwała biegunka. Wszystkie zwierzęta zakażone wytworzyły przeciwciała specyficzne dla podanego szczepu wirusa. Ciekawe okazały się wyniki podwójnego zakażenia, w wyniku którego u cieląt namnażały się niezależnie obydwie wirusy i wytworzyły one przeciwciała neutralizujące obydwie szczepy. Doświadczenie to pokazało, że krajowe bydło jest wrażliwe na

zakażenie atypowym wirusem, a przebieg zakażenia jest podobny do obserwowanego w przypadku zakażeń krajowymi BVDV-1. BVDV-3 może powodować również immunosupresję, która może prowadzić do zakażeń wtórnych i powodować zaburzenia w rozrodczości oraz straty w hodowli bydła. Jednocześnie przy braku odpowiednich narzędzi diagnostycznych, wykrycie atypowego pestiwirusa, czy specyficznych przeciwciał może być opóźnione lub niemożliwe. Problemy te próbowaliśmy rozwiązać w sposób opisany w kolejnej części.

Problemy diagnostyczne zakażeń atypowym pestiwirusem

Wstępem do tych badań jest przeglądowy artykuł V. Przy użyciu surowic pozyskanych podczas zakażenia eksperymentalnego szczepem Th/04_KhonKaen, BVDV-1 oraz koinfekcji obydwoma wirusami (artykuł IV) dokonaliśmy porównania testów serologicznych w celu oceny ich czułości, specyficzności i szybkości wykrycia specyficznych przeciwciał (artykuł III). Testy serologiczne (w większości wykorzystujące szczepy BVDV-1), których podstawą był antygen całego wirionu lub przeciwciała poliklonalne okazały się najodpowiedniejsze do wykrywania zakażeń atypowym pestiwirusem. Analiza statystyczna pozwoliła określić optymalne wartości odcięcia w tych testach, tak aby zwiększyć ich czułość i skrócić czas od zakażenia, do uzyskania wyniku dodatniego co ma zasadnicze znaczenie w skuteczności badań zwierząt poddawanych kwarantannie. W badaniach zastosowano również najnowszą technikę immunofluorescencyjną – test MIA (microsphere immunoassay). Test opracowany w SVA w Uppsali opiera się na zastosowaniu mikrokulek opłaszczonych antygenem, w tym wypadku białkiem E^{ms} atypowego pestiwirusa. Technika jest podobna do cytometrii przepływowej i pozwala wykrywać zarówno białka (antygeny i przeciwciała) jak i cząsteczki RNA i DNA. Ze względu na swoją specyficzność test MIA wykazał najwyższą efektywność w wykrywaniu przeciwciał u cieląt zakażonych BVDV-3.

Podczas gdy czułość testów serologicznych zależy od podobieństwa antygenowego pestiwirusów, wykrycie samych wirusów uzależnione jest od ich patogenności i wrażliwości stosowanych systemów komórkowych, czy zmienności genetycznej decydującej o homologii badanego fragmentu genomu wirusowego ze stosowanymi starterami i sondami w RT-PCR i w real-time RT-PCR. W artykule VI zaprezentowane zostały ilościowe metody wykrywania BVDV-1 i atypowych pestiwirusów z użyciem real-time RT-PCR. Techniki te charakteryzują się najwyższą czułością wśród metod wirusologicznych, umożliwiając jednocześnie różnicowanie gatunków BVDV. Metody te z dużym powodzeniem zostały użyte w pilotażowym programie zwalczania BVD-MD oraz będą również stosowane w urzędowych, centralnych programach zwalczania zakażeń BVDV. Znajdują one przede wszystkim

zastosowanie w największych stadach bydła ze względu na możliwości pulowania próbek i różnicowania na podstawie analizy ilościowej wirusowych kopii pomiędzy zwierzętami w ostrej fazie zakażenia tzw. zakażonymi „przejściowo” i trwale zakażonymi BVDV.

Wnioski – aspekt poznawczy, naukowy i aplikacyjny

- ⇒ W Polsce gatunkiem pestiwirusa dominującego w pogłowie bydła jest BVDV-1 należący do czterech podgrup: 1b, 1d, 1e, 1f. Niewielka zmienność polskich szczepów BVDV-1 jest korzystna ze względów diagnostycznych, jednak powoduje również większe zagrożenie dla transmisji innych pestiwirusów do populacji bydła w Polsce.
- ⇒ Badanie mleka zbiorczego prezentuje dobrą i szybką, a przede wszystkim stosunkowo niedrogą alternatywę badań przesiewowych stad krów mlecznych na obecność zakażeń BVDV i może być rekomendowane jako badane pomocnicze podczas realizacji programów zwalczania BVDV w Polsce.
- ⇒ Przebieg zakażenia atypowym pestiwirusem bydlęcym u cieląt krajowych jest podobny do obrazu zakażeń BVDV-1, jednak bez odpowiednich narzędzi diagnostycznych identyfikacja BVDV-3 może być niemożliwa.
- ⇒ Potwierdzona kontaminacja atypowym pestiwirusem bydlęcym płodowych surowic bydlęcych stosowanych w naszym laboratorium pokazuje, że na rynku polskim są preparaty, które mogą być źródłem transmisji BVDV-3 do krajowej populacji przeżuwaczy.
- ⇒ Wykrycie zakażeń atypowymi pestiwirusami bydlęcymi wymaga użycia dedykowanych dla tych patogenów testów diagnostycznych. Wyniki komercyjnie dostępnych testów do diagnostyki zakażeń BVDV-1 mogą być niewiarygodne i wymagają odpowiedniej walidacji dla poprawy skuteczności wykrywania BVDV-3.
- ⇒ Adaptacja szerokiego zakresu metod biologii molekularnej i kompleksowa ocena ich skuteczności diagnostycznej umożliwiła powstanie jedyne w Polsce laboratorium prowadzącego w pełnym zakresie badania nad BVDV i patogenezą zakażeń tym wirusem.
- ⇒ Opracowywane przeze mnie zagadnienia diagnostyki laboratoryjnej zakażeń BVDV stanowią istotny wkład do programu zwalczania zakażeń tym wirusem, który został przyjęty jako program Głównego Lekarza Weterynarii do realizacji w skali kraju.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych:

5.1. Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych

Bezpośrednio po ukończeniu studiów w 2001 r. odbyłam **trzymiesięczny staż w klinice koni Catedra de Cirugia del Departamento de Patologia Animal II, Facultad de Veterinaria, Universidad de Complutense de Madrid** w Hiszpanii pod opieką prof. Fidela San Roman Ascaso. Praca ta była kontynuacją moich praktyk studenckich podczas zagranicznego stypendium Sokrates-Erasmus, które uzyskałam w 1999 r. na realizację jednego semestru studiów studenckich na tym wydziale. Podczas stażu moje obowiązki obejmowały wizyty terenowe i ambulatoryjne oraz zabiegi operacyjne w klinice koni. Po powrocie do Polski, w **sierpniu 2001 r. podjęłam pracę na stanowisku lekarza wet. w Zakładzie Wirusologii, Państwowego Instytutu Weterynaryjnego** pod kierownictwem prof. Jana F. Żmudzińskiego, gdzie pracuję do tej pory. Pierwsze doświadczenia dotyczyły głównie pracy w laboratorium diagnostyki **pasażowalnych encefalopatii gąbczastych (TSE)** we współpracy z dr Miroslawem M. Polakiem (obecnie prof. nadzw.). W tym czasie w Polsce rozpoczęto monitoring czynny BSE i przez pierwsze miesiące jego trwania nasze laboratorium badało próbki rdzenia przedłużonego od bydła z całej Polski. W tym czasie rozwijały się moje zdolności techniczne w badaniach laboratoryjnych. W tym okresie nasz zespół opracował i wprowadził szereg metod do szybkich badań i potwierdzania TSE u zwierząt, wykryliśmy pierwsze przypadki klasycznego, a następnie atypowego BSE. W późniejszym etapie wprowadziliśmy metody różnicowania BSE i trzęsawki owiec oraz wykryliśmy pierwsze przypadki jej atypowej postaci. W tym okresie oprócz badań naukowych nabrałam dużego doświadczenia w walidacji metod, systemie jakości badań, kontrolowaniu prawidłowości i bezpieczeństwa badań oraz prowadzeniu audytów/kontroli w laboratoriach diagnostycznych ZHW. Przeszłam również szereg szkoleń m.in. z diagnostyki BSE testem Western blot w firmie Prionics w Szwajcarii; z badań potwierdzających techniką SAF immunoblot w Friedrich-Loeffler-Institut w Niemczech; i kontroli TSE w CIDC-Lelystad w Holandii.

Praca ta zaowocowała następującymi publikacjami :

- Polak M.P., Larska M., Rożek W., Żmudziński J.F.: Różnicowanie BSE i trzęsawki w pogłowie owiec i kóz. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 1298-1301; Pkt MNiSW₂₀₀₆=10; udział własny: badania laboratoryjne, udział w pisaniu wyników i dyskusji – 30%.
- Polak M.P., Rola J., Rożek W., Larska M., Żmudziński J.F.: Działalność krajowego laboratorium referencyjnego BSE i trzęsawki. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 608-610; Pkt MNiSW₂₀₀₆=10; udział własny: uczestnictwo w szkoleniu i przygotowaniu testów biegiłości dla laboratoriów oraz udział w przygotowaniu manuskryptu – 20%.

- Polak M.P., Larska M., Rola J., Żmudziński J.F.: Białko prionowe w tkance mięśniowej ludzi i zwierząt. *Medycyna Wet.* 2005, 61 (10), pp. 1119-1121; IF₂₀₀₅=0,259, Pkt MNiSW₂₀₀₅=10; udział własny: analiza piśmiennictwa, opracowanie tekstu publikacji przeglądowej – 90%.
- Polak M., Rożek W., Larska M., Rola J., Żmudziński J.F.: Ocena wyników monitoringu czynnego BSE w Polsce w latach 2001-2004. *Medycyna Wet.* 2005, 61 (6), pp. 654-656; IF₂₀₀₅=0,259, Pkt MNiSW₂₀₀₅=10; udział własny: badania laboratoryjne, edycja tekstu – 20%
- Polak M.P., Larska M., Żmudziński J.F.: Nowe szybkie testy do diagnostyki post mortem BSE. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 876-878; IF₂₀₀₃=0,236, Pkt MNiSW₂₀₀₃=10; udział własny: przygotowanie manuskryptu - 30%.
- Polak M.P., Larska M., Rożek W., Żmudziński J.F.: Usefulness of rapid tests for diagnosis of BSE. *Bull. Vet. Inst. Pul.* 2003, 47, 89-93; IF₂₀₀₃=0,190, Pkt MNiSW₂₀₀₃=15; udział własny: przygotowanie manuskryptu - 30%.
- Larska M., Polak M.P. : Rola krwi w transmisji chorób prionowych. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 670-672; IF₂₀₀₃=0,236, Pkt MNiSW₂₀₀₃=10; udział własny: analiza piśmiennictwa, przygotowanie pracy- 90%
- Polak M.P., Rożek W., Rola J., Larska M., Żmudziński J.F., Kozaczyński W., Reichert M., Wijaszka T., Ankiewicz K., Piróg-Komorowska A., Roels S.: Pierwsze przypadki BSE w Polsce. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 852-856; IF₂₀₀₂=0,264, Pkt MNiSW₂₀₀₂=10; udział własny: badania laboratoryjne, analiza wyników, korekta tekstu - 10%.
- Polak M.P., Larska M., Rożek W., Rola J., Żmudziński J.F.: Szybkie testy diagnostyczne stosowane w Polsce w monitoringu BSE. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 767-769; IF₂₀₀₂=0,264, Pkt MNiSW₂₀₀₂=10; udział własny: opracowanie tekstu - 30%.

Ponieważ moje zainteresowania już od początku pracy koncentrowały się również wokół zagadnień dotyczących chorób koni w 2004 r. Rada Naukowa PIWet-PIB udzieliła mi zgody na otwarcie przewodu doktorskiego dotyczącego „**Diagnostyki i pokrewieństwa filogenetycznego szczepów wirusa zapalenia tętnic koni (EAV)**” pod kierownictwem promotora prof. dr hab. Jerzego Roli. Jednym z ważniejszych osiągnięć mojej pracy była **charakterystyka molekularna polskich szczepów EAV, określenie statusu epizootycznego stad i stadnin koni oraz opracowanie oryginalnych metod diagnostycznych tj. RT-PCR, RT-PCR w czasie rzeczywistym, test immunoperoksydazowy pośredni do potwierdzania izolacji wirusa w hodowli komórkowej**. Duża część badań koncentrowała się na kontroli zakażeń w populacji koni poprzez identyfikację i eliminację ogierów siewców wirusa. Ciekawymi i oryginalnymi badaniami były **badania zmienności EAV podczas zakażenia**

trwałego ogierów w czasie. Wyniki moich badań zostały opisane w następujących publikacjach:

- Larska M., Rola J.: Molecular epizootiology of equine arteritis virus isolates from Poland. Vet. Microbiol. 2008, 127, 392-398; IF₂₀₀₈=2,370, Pkt MNiSW₂₀₀₈=40; udział własny: zbieranie próbek, ekstrakcja RNA, RT-PCR, sekwencjonowanie i oczyszczanie produktów amplifikacji, analiza filogenetyczna, opracowanie publikacji – 90%.
- Larska M., Rola J. : Zastosowanie cytometrii przepływowej do oceny wrażliwości wybranych linii komórkowych na zakażenie wirusem zapalenia tętnic koni. Medycyna Wet. 2008, 64, 105-109; Pkt MNiSW₂₀₀₈=10; udział własny: izoalcja wirusa, mianowanie wirusa, hodowla komórkowa, utrwalanie I permabilizacji komórek, znakowanie komórek przeciwciałami, opracowanie protokołów do cytometrii I analiza cytometryczna, przygotowanie publikacji – 90%.
- Rola J., Larska M., Woźniak, B., Rola, J.G., Krawczyk, C.H., Żmudziński, J.F.: Shedding course of the virus in a stallion naturally infected with a equine arteritis virus - A case report. Bull. Vet. Inst. Pul. 2007, 51, 321-324; ; IF₂₀₀₇=0,273; Pkt MNiSW₂₀₀₇=15; udział własny: zebranie materiału, badania laboratoryjne, opracowanie tekstu publikacji – 70%.
- Larska M., Rola J.: Zróżnicowanie genetyczne szczepów EAV wśród trwale zakażonych ogierów w stadach ogierów w Polsce. Medycyna Wet. 2007, 63, 1381-1386; Pkt MNiSW₂₀₀₇=10; udział własny: zbieranie próbek, ekstrakcja RNA, RT-PCR, sekwencjonowanie i oczyszczanie produktów amplifikacji, analiza filogenetyczna, opracowanie publikacji – 90%.
- Larska M., Rola J. : Zastosowanie testu immunoperoksydazowego pośredniego do potwierdzania tożsamości izolatów EAV. Medycyna Wet. 2007, 63, 712-716; Pkt MNiSW₂₀₀₇=10; Udział własny: zebranie i izolacja wirusów w hodowli komórkowej, oczyszczenie antygeny wirusowego, immunizacja królików dla uzyskania surowicy poliklonalnej, optymalizacja testu immunoperoksydazowego, opracowanie publikacji – 90%.
- Larska M., Rola J. : Zmienność genetyczna wirusa a diagnostyka zakażeń EAV. Medycyna Wet. 2006, 62, 1348-1351; Pkt MNiSW₂₀₀₆=10; udział własny: przygotowanie publikacji – 90%.
- Rola J., Larska M., Żmudziński J.F.: Zastosowanie testu RT-PCR do wykrywania obecności wirusa zapalenia tętnic koni w nasieniu ogierów. Medycyna Wet. 2004, 60, 289-291; IF₂₀₀₄=0,285, Pkt MNiSW₂₀₀₄=10; udział własny: badania laboratoryjne, opracowanie tekstu – 80%.
- Larska M., Rola J.: RT-PCR as effective detection method of equine arteritis virus in the semen of naturally infected stallions. Bull. Vet. Inst. Pul. 2003, 47, 307-313; IF₂₀₀₃=0,190; Pkt MNiSW₂₀₀₃=15; udział własny: badania laboratoryjne, opracowanie tekstu publikacji – 60%.

Konsekwencją zakończenia tego etapu badań było **uzyskanie stopnia doktora nauk weterynaryjnych w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym w Puławach** na podstawie pracy obronionej publicznie w czerwcu 2006 r.

Szczególnie ważną kontynuacją tych badań były wyniki wśród **koni huculskich** opublikowane nieco później. Stwierdziliśmy wysoki, ponad 50% odsetek dodatnich seroreagentów wśród tej prymitywnej rasy koni i zidentyfikowaliśmy ogierzy siewców wirusa. Ciekawym odkryciem była możliwość **transmisji poziomej EAV bezpośrednio między ogierami**, czyli zakażenia trwałego, do którego mogło dojść drogą oddechową u ogierów. Obserwacja ta wskazywała na dodatkowe drogi szerzenia się wirusa w stadzie. Wyniki te opublikowano w pracy:

- Rola J., Larska M., Rola J.G., Belák S., Autorino G.L.: Epiziotology and phylogeny of equine arteritis virus in hucul horses. Vet. Microbiol. 2011, 148, 402-407; IF₂₀₁₁=3,327; Pkt MNiSW₂₀₁₁=40; udział własny: badania laboratoryjne, opracowanie tekstu publikacji – 70%.

5.2. Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych

Po uzyskaniu stopnia doktora n. wet. w celu rozwijania swoich zdolności do prowadzenia doświadczeń zakażeń eksperymentalnych na zwierzętach oraz doskonalenia technik badań wirusologicznych przyjąłam propozycję rocznego stażu w **Veterinary Research Institute na wyspie Lindholm w Danii** pod kierownictwem prof. Sorena Aleksandersena. **Badania te dotyczyły wrażliwości wielbłądów na zakażenie wirusem pryszczycy (FMDV)**. Doświadczenia były finansowane przez Szejka Dubaju Mohammeda bin Rashid Al Maktouma, na którego zaproszenie część badań przeprowadziłam w **laboratorium Centralnego Laboratorium Weterynaryjnego (CVRL) w Dubaju** pod kierownictwem światowej sławy badacza prof. Ulricha Wernery. Doświadczenie rozpoczynała eksperymentalna ekspozycja wielbłądów jedno- i dwugarbnych na zakażenie wysoce patogennym szczepem FMDV, a następnie monitorowanie stanu zdrowia i pobieranie próbek do dalszych badań. Wyniki były zaskakujące, gdyż okazało się, że baktriany (wielbłądy dwugarbne) są wrażliwe na zakażenie tym patogenem w odróżnieniu do dromaderów. W ramach badań udało mi się wyprowadzić i namnożyć hodowle pierwotne komórek wielbłądzich m.in. nabłonka skóry, małżowiny nosowej i nerki, które zostały zbankowane w laboratoriach w Dubaju i w Danii, a które posłużyły m.in. do wyjaśnienia różnic wrażliwości na FMDV między różnymi gatunkami wielbłądów oraz przeżuwaczy domowych. Prowadziłam również badania we współpracy z grupą prof. Xuepeng Cai z Lanzhou Veterinary Research Institute z Chin. Razem z naukowcami chińskimi podjęliśmy próbę wyjaśnienia wrażliwości gatunkowej wielbłądów na zakażenie FMDV poprzez różnice w strukturze białkowej i ekspresji receptorów integrynowych w pierwotnych miejscach zakażenia u tych zwierząt. Wynikiem tych badań były następujące publikacje:

- Larska M., Wernery, U., Kinne J., Schuster R., Alexandersen G., Alexandersen S.: Differences in the susceptibility of dromedary and Bactrian camels to foot-and-mouth disease virus. *Epidemiol. Infect.* 2009, 137, 549-554; IF₂₀₀₉= 2,365; Pkt MNiSW₂₀₀₉=25; udział własny: zakażenie doświadczalne, badania laboratoryjne, opracowanie tekstu publikacji – 70%.
- Du J., Larska M., Chang H., Alexandersen S., Ca, X.: Molecular cloning and phylogenetic analysis of integrins alphavbeta1 and alphavbeta6 of one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010, 135, 164-171; IF₂₀₁₀= 2,176; Pkt MNiSW₂₀₁₀=30; udział własny: koncepcja, badania laboratoryjne, opracowanie części tekstu publikacji – 60%.

Po powrocie do Polski w 2008 r. zajęłam się badaniami nad atypowymi przypadkami BSE, których liczba u krajowego bydła rosła, a których etiologia nie jest poznana. Część badań przeprowadziłam w CISA-INIA w Valdeolmos koło Madrytu w ramach uzyskanego stypendium organizacji NeuroPrion pod kierownictwem prof. Juana Marii Torresa. Tematem pracy była **charakterystyka patogenności i transmisji BSE typu L i H (tzw. atypowe BSE)** na modelu myszy transgenicznych. Badania były nowatorskie i w ich trakcie udało nam się wykazać, że białko atypowego BSE w trakcie pasażu na myszach może nieoczekiwanie zmienić swoją strukturę upodabniając się do klasycznego BSE. Na podstawie tego postawiliśmy wniosek, że epidemia BSE, a co za tym idzie również vCJD mogła rozpocząć się od transmisji i dalszej propagacji białka atypowego. Wyniki tych badań opublikowane zostały w pracy:

- Torres J.M., Andréoletti O., Lacroux C., Prieto I., Lorenzo P., Larska M., Baron T., Espinosa J.C.: Classical bovine spongiform encephalopathy by transmission of H-type prion in homologous prion protein context. *Emerg. Infect. Dis.* 2011, 17, 1636-1644; IF₂₀₁₁= 6,169; Pkt MNiSW₂₀₁₁=45; udział własny: koncepcja, przygotowanie inokulum, zakażenie eksperymentalne myszy, sekcje i pobieranie materiału, korekta tekstu publikacji – 20%.

Kolejnym osiągnięciem była **charakterystyka atypowych przypadków BSE wyizolowanych od polskiego bydła na podstawie analizy ekspresji wybranych genów**. Różnice w profilach ekspresji niektórych genów tj. kaspaza 3, białko Bax i 14-3-3 pozwoliły różnicować bydło zakażone klasycznym i atypowym BSE od zwierząt zdrowych. Dodatkowo nadekspresja genu białka SOD1 oraz genów kodujących białka Bcl-2 i Fyn pozwoliła odróżnić odpowiednio BSE typu H i klasyczne BSE. Białka te miały potencjał białek markerowych ułatwiających diagnostykę pasażowalnych encefalopatii u bydła. Wyniki zostały zaprezentowane na konferencji Prion2009 w Thessalonikach, w Grecji i wyróżnione przez Newsletter NeuroPrion w 2009 r.. Dane te zostały również opublikowane w pracy:

- Larska M., Polak M.P., Żmudziński J.F., Torres J.M.: Comparison of mRNA expression levels of selected genes in the brain stem of cattle naturally infected with classical and atypical BSE. *Brain Res.* 2010, 1351, 13-22; IF₂₀₁₀= 2,728; Pkt MNiSW₂₀₁₀=25; udział własny: koncepcja, badania laboratoryjne, analiza statystyczna, przygotowanie publikacji oraz jej korekta po recenzji – 90%.

We współpracy z Instytutem Zootechniki – PIB w Krakowie-Balicach dokonaliśmy dalszej charakterystyki polskich klasycznych i atypowych przypadków BSE. Następnie opisaliśmy również **dwa pierwsze przypadki atypowej trzęsawki NOR98** u owiec w Polsce. Prace te przedstawiono w następujących artykułach:

- Gurgul A., Polak M.P., Larska M., Słota E.: PRNP and SPRN genes polymorphism in atypical bovine spongiform encephalopathy cases diagnosed in Polish cattle. *J. Appl. Gen.* 2012, 53, 337-342; IF₂₀₁₁= 1,664; Pkt MNiSW₂₀₁₂=20; udział własny: koncepcja, przygotowanie publikacji oraz jej korekta po recenzji – 20%.
- Gurgul A., Czarnik U., Larska M., Polak M.P., Strychalski J., Słota E.: Polymorphism of the prion protein gene (PRNP) in Polish cattle affected by classical bovine spongiform encephalopathy. *Mol. Biol. Rep.* 2012, 39, 5211-5217; IF₂₀₁₁= 2,929; Pkt MNiSW₂₀₁₂=15; udział własny: koncepcja, przygotowanie publikacji oraz jej korekta po recenzji – 20%.
- Polak M.P., Larska M., Langeveld J.P.M., Buschmann A., Groschup M.H., Żmudziński J.F.: Diagnosis of the first cases of scrapie in Poland. *Vet. J.* 2010, 186, 47-52; IF₂₀₁₀= 2,240; Pkt MNiSW₂₀₁₀=45; udział własny: badania laboratoryjne, przygotowanie publikacji – 40%.

W ostatnich latach pracy odeszłam nieco od chorób wirusowych koni, które dominowały podczas realizacji pracy doktorskiej, a skoncentrowałam się na chorobach przeżuwaczy. Moje zainteresowania zakażeniami trwałymi EAV u ogierów zainspirowały mnie do badań nad patogenezą zakażeń wirusem biegunki bydła (BVD), który również posiada zdolność wywoływania zakażeń trwałych. Mimo, że mechanizm działania wirusów i gatunki zwierząt na nie wrażliwych są różne, patogeny posiadają podobne właściwości biologiczne. Zwalczenie zakażeń EAV i BVDV oparte są na tej samej zasadzie, eliminacji zwierząt trwale zakażonych jako głównego rezerwuaru patogenu w populacji odpowiednio koni i bydła.

Syntetycznym opracowaniem prezentującym moją aktywność naukową ostatnich paru lat dotyczącą badań nad **rozprzestrzenieniem i patogenezą wirusa BVD-MD** jest cykl wybranych publikacji przedstawionych w Pkt 4. Moje osiągnięcia w tym temacie oprócz wartości poznawczych mają również aspekt aplikacyjny dla opracowywanych programów zwalczania wirusowej biegunki bydła. Specyfika hodowli bydła i sytuacji epizootycznej w kraju wymaga optymalizacji metod diagnostycznych oraz indywidualnego doboru

postępowania w celu eliminacji wirusa ze stada. Identyfikacja zwierząt trwale zakażonych BVDV w kraju, gdzie prewalencja wirusa jest wysoka może być utrudniona ze względu na maskowanie antygeny wirusowego u cieląt przez przeciwciała siarowe. W celu rozwiązania tego problemu opracowaliśmy koncepcję badań opisanych w manuskrypcie:

- Larska M., Kuta A., Polak M.P.: Evaluation of diagnostic methods to distinguish between calves persistently and transiently infected with bovine viral diarrhoea virus in respect to the presence of maternal antibodies. Bull. Vet. Inst. Pul. 2013 [w druku]; IF₂₀₁₂= 0,377; Pkt MNiSW₂₀₁₂=20; udział własny: koncepcja, analiza statystyczna, przygotowanie publikacji – 80%

W artykule skoncentrowaliśmy się na rozwiązaniu dwóch problemów diagnostycznych: 1) obecności przeciwciał matczynych utrudniających szybką identyfikację PI oraz 2) różnicowania zwierząt PI i zakażonych „przejściowo” (tzw. TI – transiently infected). Największą czułość w wykrywaniu PI, niezależnie od biernej odporności cieląt i genotypu wirusa wykazały klasyczny i real-time RT-PCR (czyli tzw. RT-PCR w czasie rzeczywistym) w odróżnieniu od ELISA do wykrywania wirusowych antygenów, które dawały wyniki fałszywie ujemne. W celu różnicowania PI i TI bez konieczności powtórnego badania ustalono optymalne wartości odcięcia dla real-time RT-PCR używając analizy krzywej ROC. Wartości cyklu odcięcia $Ct \leq 29.10$ (odpowiadające ok. 10^5 kopii wirusowego RNA/ μ l) odpowiadały trwałemu zakażeniu ze 100% prawdopodobieństwem, natomiast $Ct > 32,06$ (odpowiadające poniżej 10^4 kopii wirusowego RNA/ μ l) określały zakażenie „przejściowe”. Między tymi wartościami znajdowała się strefa wyników wątpliwych, które wymagały powtórnego badania i obejmowała ona około 17% PI i 11% TI). Zastosowanie proponowanych wartości odcięcia umożliwiłoby obniżenie wieku badanych zwierząt, szybkie wykrywanie PI i ich eliminację, co równa się wczesnemu usuwaniu siewców wirusa ze stada. Obniżone zostałyby również koszty badań wynikające z konieczności ponownego badania oraz zmniejszeniu ryzyka pomyłki w razie złej identyfikacji zwierząt.

Oprócz zakażeń pestiwirusowych jestem włączona w diagnostykę innych chorób o podłożu wirusowym bydła. Uczestniczyłam w pracach nad zakażeniami **bydlęcym syncytialnym wirusem oddechowym (BRSV)**, podczas których udało nam się scharakteryzować po raz pierwszy polskie szczepy. Ponieważ jestem zaangażowana w pilotażowe **programy zwalczania zakażeń BVD-MD i IBR-IPV** w stadach bydła, dlatego uczestniczę również w badaniach nad zakażeniami BHV1 u bydła. Ta działalność ma odzwierciedlenie w następujących publikacjach:

- Rola J., Socha W., Polak M.P., Larska M.: Diagnostyka zakażeń syncytialnym wirusem oddechowym bydła. *Medycyna Wet.* 2009, 65, 88-91; Pkt MNiSW₂₀₀₉=6; udział własny: korekta publikacji – 10%.
- Socha W., Larska M., Rola J.: Molecular characterisation of the first Polish isolates of bovine respiratory syncytial virus. *Bull. Vet. Inst. Pul.* 2009, 53, 569-574; IF₂₀₀₉= 0,219; Pkt MNiSW₂₀₀₉=15; udział własny: analiza sekwencji, przygotowanie rycin i tekstu publikacji – 40%.
- Rola J., Larska M., Polak M.P., Żmudziński J.F.: Kontrola zakażeń BHV1 u buhajów w Polsce. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 330-332; Pkt MNiSW₂₀₀₇=10; udział własny: przygotowanie publikacji – 30%.
- Rola J., Larska M., Polak M.P.: Detection of bovine herpesvirus 1 from an outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Bull. Vet. Inst. Pul.* 2005, 49, 267-271; IF₂₀₀₅= 0,290; Pkt MNiSW₂₀₀₉=15; udział własny: badania laboratoryjne, przygotowanie części publikacji – 40%.

Moja współpraca z dr hab. Mirosławem P. Polakiem, prof. nadzw. zaowocowała wspólnymi projektami naukowymi (Pkt 7) dotyczącymi **zakażeń BVDV w Polsce**. W 2013 r. zostałam **promotorem pomocniczym** doktorantki mgr Aleksandry Kuty, której promotorem głównym jest prof. Polak. Tytuł pracy obejmuje „Występowanie oraz charakterystykę molekularną szczepów wirusa biegunki bydła w Polsce”. Wcześniej moje własne zainteresowania naukowe zaczęły się koncentrować wokół atypowych pestiwirusów przeżuwaczy (określanych mianem HoBi-podobnych, od nazwy pierwszego scharakteryzowanego szczepu). W styczniu 2010 roku podjęłam dwuletni staż podoktorancki jednocześnie w Katedrze Nauk Klinicznych, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej (SLU) oraz w Zakładzie Wirusologii, Immunobiologii i Parazytologii (VIP), Szwedzkiego Instytutu Weterynaryjnego (SVA) w Uppsali, w Szwecji. Moimi opiekunami naukowymi zostali prof. Stefan Alenius z SLU, legenda zwalczania BVD-MD w Szwecji oraz prof. Sándor Belák, światowej sławy wirusolog i ekspert z ramienia OIE, FAO i EC. Badania przeprowadzone w Szwecji oraz ich kontynuacja w Polsce stały się źródłem niektórych publikacji przedstawianych jako osiągnięcie naukowe w Pkt 4.

Zakażenia atypowymi pestiwirusami bydłecy potwierdzono u przeżuwaczy w Ameryce Południowej i Azji. W Brazylii wirusy te izolowano od bawołów wodnych, dlatego też podejrzewano, że zwierzęta te mogą być naturalnym rezerwuarem HoBi-podobnych wirusów. W 2012 r. zakażenia atypowymi pestiwirusami stwierdzono u bydła we Włoszech. Współpraca z naukowcami ze Szwecji i Włoch zaowocowała następującym artykułem:

- Xia H., Larska M., Giammarioli M., De Mia G.M., Cardeti G., Zhou W., Alenius S., Belák S., Liu L.: Genetic detection and characterization of atypical bovine pestiviruses in foetal bovine sera

claimed to be of Australian origin. *Transbound. Emerg. Dis.* 2013, 60, 284-288; IF₂₀₁₂=2.096; Pkt MNiSW₂₀₁₂=35; udział własny: udział w opracowaniu koncepcji, zgromadzenie materiału do badań, uczestnictwo w badaniach laboratoryjnych (RT-PCR, sekwencjonowanie), analiza filogenetyczna, współtworzenie manuskryptu i jego korekta po recenzji – 40%.

W wyniku badań płodowych surowic bydlęcych (FBS) pochodzących z Australii wykryliśmy ich kontaminację atypowym pestiwirusem. Wskazuje to, że udział w transmisji tych wirusów mogą mieć również inne kontynenty. W Australii produkowane są komercyjne FBS stosowane w diagnostyce i do produkcji biopreparatów na całym świecie, co może zwiększać ryzyko dalszego rozprzestrzeniania się BVDV-3. Obecność atypowych pestiwirusów potwierdziliśmy również w surowicach płodowych używanych do hodowli komórkowych w Polsce (artykuł VI). Badania nasze wywołały m.in. międzynarodową dyskusję na temat znaczenia atypowych pestiwirusów i oficjalnej ich klasyfikacji jako nowego gatunku BVDV, co może mieć kluczowe znaczenie dla planów zwalczania tych zakażeń w Europie. Nasz komentarz do sytuacji epizootycznej BVDV-3 znalazł się w publikacji:

- Liu L., Larska M., Xia H., Uttenthal A., Polak M.P., Ståhl K., Alenius S., Shan H., Yin H., Belák S.: Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2012, 18, 1917-1978; IF₂₀₁₂=5,993; Pkt MNiSW₂₀₁₂=45; udział własny: współtworzenie manuskryptu i jego poprawa po recenzji – 30%.

Dużym osiągnięciem tych badań było zwiększenie świadomości środowiska naukowego i diagnostów weterynaryjnych, co doprowadziło chociażby do włączenia atypowych pestiwirusów do panelu pestiwirusów w międzynarodowych badaniach biegłości w 2012 r.

Większość publikacji, które powstały podczas mojego pobytu w Szwecji było wynikiem realizacji projektów krajowych i międzynarodowych we współpracy z naukowcami duńskimi (prof. Å. Uttenthal), angielskimi (dr R. Strong; V. Riitho), niemieckimi (prof. P. Becherem) i włoskimi (prof. G.M. De Mia). W ramach projektu Epizone (Pkt 7.2) opieką naukową objęłam: doktoranta S. Gao z instytutu w Lanzou z Chin, który uczestniczył w badaniach molekularnych w SVA w Uppsali oraz doktoranta V. Riitho z AHVLA w Weybridge w Wielkiej Brytanii, który brał udział w zakażeniu eksperymentalnym atypowym pestiwirusem cieląt w PIWet-PIB w Puławach. Współpraca z V. Riitho i jego promotorem dr S. Grahamem zaowocowała wspólnym projektem dotyczącym immunopatologii zakażeń BVDV, którego wyniki prezentowaliśmy już na międzynarodowych konferencjach w Holandii i Niemczech i na podstawie których przygotowujemy wspólne publikacje. Przedłużeniem tej działalności jest również projekt opisany w Pkt 7.1. Podczas pracy w Szwecji odbyłam również

dwutygodniowy zaawansowany kurs epidemiologii weterynaryjnej zorganizowany przez Norweską Szkołę Medycyny Weterynaryjnej w Oslo, a prowadzony przez światowej sławy epizootiolog prof. Iana Dahoo. Kurs ukończyłam z bardzo dobrym wynikiem (8 ECTS). W Szwecji realizowałam również projekt dotyczący reniferów jako rezerwuaru pestiwirusów. Celem badań była **ocena prewalencji zakażeń pestiwirusowych w populacji reniferów w Szwecji**. Wyniki prezentowane są w pracy:

- Kautto A.H., Alenius S., Mossing T., Becher P., Belák S., Larska M. : Pestivirus and alphaherpesvirus infections in Swedish reindeer (*Rangifer tarandus tarandus* L.). *Vet. Microbiol.* 2012, 156, 64-71, IF₂₀₁₂= 3,127; Pkt MNiSW₂₀₁₂= 40; udział własny: koordynacja projektu, uczestnictwo w badaniach laboratoryjnych (test neutralizacji wirusa, namnażanie i mianowanie szczepów pestiwirusowych, test immunoperoksydazowy), opracowanie wyników badań, analiza epizootyczna, napisanie pracy oraz jej korekta po recenzjach – 70%.

Badania wykazały stosunkowo wysoki, ponad 30-procentowy, odsetek dodatnich seroreagentów wśród reniferów. Interesujący jest fakt, że zakażenia BVDV zwalczono u bydła z regionów północnych, pokrywających się ze środowiskiem bytowania reniferów już pod koniec XX w. Badania real-time RT-PCR z użyciem pan-pestiwirusowych starterów wybranych surowic zwierząt z regionów o najwyższej seroprewalencji dały wyniki ujemne. Wysoką seroprewalencję u reniferów wyjaśniły następnie wyniki testów neutralizacji wirusa z użyciem panelu różnych gatunków pestiwirusów. Surowice reniferów wykazywały najwyższe miana przeciwciał neutralizujących dla szczepów wirusów choroby granicznej typu 1 (BDV-1) oraz BDV-2 (szczep wyizolowany od renifera i bizona z ogrodu zoologicznego w Niemczech pozyskany poprzez współpracę z prof. P. Becherem) w odróżnieniu do niższych wartości dla BVDV-1 oraz braku przeciwciał reagujących z BVDV-2 i BVDV-3. Wskazywało to, że wśród reniferów szerzył się wirus endemiczny dla tego gatunku przeżuwaczy, co przypominało sytuację obserwowaną u innych zwierząt wolno żyjących, tj. kozic pirenejskich (*Rupicapra pyrenaica*) zakażonych BDV-4 i żyraf, od których izolowano niesklasyfikowanego dotąd taksonomicznie pestiwirusa.

Po powrocie do kraju do moich obowiązków doszło opracowanie metod diagnostycznych **nowego wirusa Schmallerberg (SBV)**, który pojawił się w Europie w 2011 r. Na początku 2012 r. wprowadziłam real-time RT-PCR, a następnie testy serologiczne do badań zakażeń SBV. Dodatkowo opracowałam oryginalny test immunoperoksydazowy pośredni do potwierdzania tożsamości SBV w hodowli komórkowej. W sierpniu 2012 r. wykryliśmy przypadki bezobjawowych zakażeń SBV u bydła i kuczmanów (wektorów

owadach SBV) i dokonaliśmy **pierwszej izolacji wirusa w kraju**, co zostało opisane niedawno w publikacji:

- Larska M., Polak M.P., Grochowska M., Lechowski L., Związek J.S., Żmudziński J.F.: First report of Schmallenberg virus infection in cattle and midges in Poland. *Transbound. Emerg. Dis.* 2013, 60, 97-101; IF₂₀₁₂=2,096; Pkt MNiSW₂₀₁₀=35; udział własny: badania laboratoryjne bydła i kuczmanów, przygotowanie publikacji – 80%

W październiku 2012 r. potwierdziliśmy pierwszy kliniczny przypadek **zakażenia śródmacicznego SBV** u cielaka, a następne kolejne u jagniąt. Obraz kliniczny, zmiany sekcyjne i przebieg dochodzeń epizootycznych przedstawiliśmy w pracach:

- Larska M., Jasik A., Żmudziński J.F.: Przypadki kliniczne zakażeń wirusem Schmallenberg w Polsce. *Medycyna Wet.* 2013, 69, 428-431; Pkt MNiSW₂₀₁₀=10; udział własny: prowadzenie sekcji, pobieranie materiału, badania laboratoryjne, przygotowanie rycin i publikacji, korekta po recenzji – 90%.
- Larska M., Tarkowska K., Kuta A., Fidler-Kwiatek E., Ciastek M., Żmudziński J.F.: Obraz kliniczny zakażeń wirusem Schmallenberg. *Życie Wet.* 2013, 88, 488-492; MNiSW₂₀₁₀=4; udział własny: prowadzenie sekcji, pobieranie materiału, badania laboratoryjne, przygotowanie rycin i publikacji, korekta po recenzji – 80%.

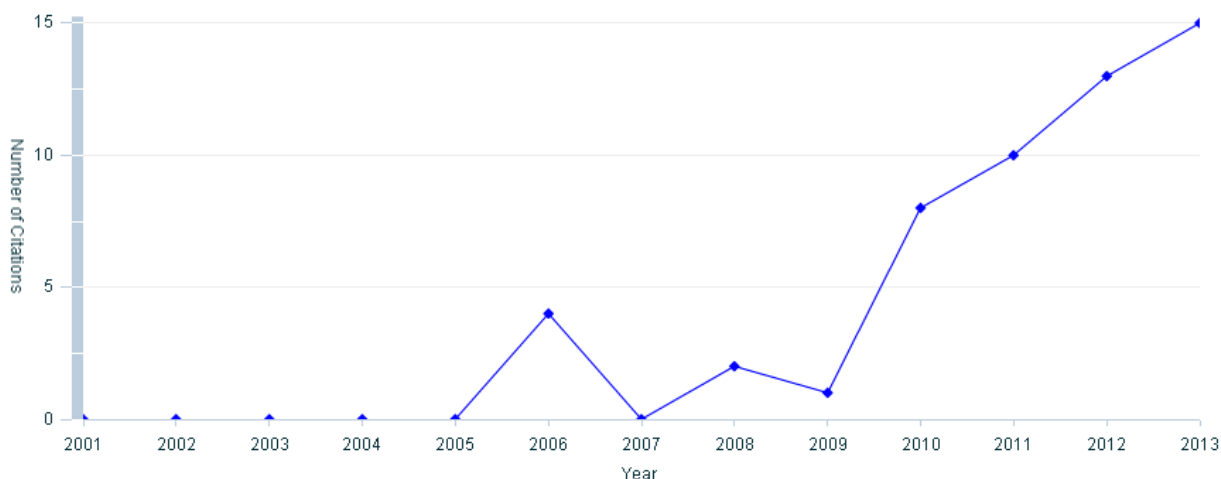
Kolejnymi osiągnięciami w tematyce zakażeń SBV było wykrycie **transmisji SBV do populacji wolno żyjących przeżuwaczy**, w tym łosia i żubrów z Narodowego Parku Krajobrazowego w Białowieży. Jednakże przełomowym odkryciem w badaniach nad zakażeniami SBV było **wykazanie po raz pierwszy możliwości transmisji transowarialnej SBV w populacji kuczmanów oraz charakterystyka gatunku *Culicoides punctatus* jako możliwego nowego wektora dla wirusa**. Wyniki tych badań opisano w następujących manuskryptach:

- Larska M., Krzysiak M., Smreczak M., Polak M.P., Żmudziński J.F.: First report on Schmallenberg virus detection in elk (*Alces alces*) in connection with the transmission of the virus into the wildlife of Białowieża National Park in Poland. *Vet. J.* 2013 [w druku]; IF₂₀₁₂=2,424; Pkt MNiSW₂₀₁₂=45; udział własny: badania laboratoryjne, opracowanie rycin i publikacji -70%
- Larska M., Lechowski L., Grochowska M., Żmudziński J.F.: Detection of the Schmallenberg virus in nulliparous *Culicoides punctatus* and *C. obsoletus/scoticus* complex – the possibility of transovarial virus transmission in the midge population and of a new vector. *Vet. Microbiol.* 2013 [opublikowany online: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.07.015>]; IF₂₀₁₂=3,127; Pkt MNiSW₂₀₁₂=40; udział własny: badania laboratoryjne, analiza statystyczna, opracowanie rycin i publikacji -70%.

6. Podsumowanie dorobku publikacyjnego.

Jestem autorką 43 prac z listy JRC (28 opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora), w tym 36 to prace oryginalne, a 7 to prace przeglądowe. Ponad połowa moich prac opublikowanych została w języku angielskim, reszta w języku polskim. Liczba cytowań według Web of Science (bez autocytowań) wynosi 38, natomiast według Scopus 53. Na konferencjach krajowych i zagranicznych prezentowałam blisko 60 doniesień plakatowych i ustnych.

Sumaryczny IF wszystkich moich publikacji wynosi 53,964. Prace moje uzyskały 876 Pkt według MNiSW. Indeks cytowań h (wyłączając autocytowania) wynosi obecnie 4. Od początku mojej aktywności naukowej liczba cytowań systematycznie rośnie, co przedstawia poniższy wykres liczby cytowań w latach 2001-2013 (źródło: Scopus, uaktualniono: 2013-07-15).



7. Wybrane projekty badawcze realizowane po uzyskaniu stopnia doktora (tytuły i numery projektów, źródła finansowania, lata i miejsca realizacji, charakter udziału przy realizacji projektu oraz wykaz najważniejszych publikacji)

- 7.1. **Ocena rozprzestrzenienia i znaczenia zakażeń wirusem Schmallenberg w Polsce**, grant NCBiR Program Badań Stosowanych (208020), 2013-2016, PIWet-PIB we współpracy z UMCS w Lublinie, kierownik, budżet: 1 108 250 PLN;
- 7.2. **Odpowiedź immunologiczna komórkowa i humoralna na zakażenie pestiwirusami była poprzez stosowanie zanieczyszczonych nimi szczepionek**, grant NCN NZ6 (198893), 2013-2016, PIWet-PIB, kierownik, budżet: 715 596 PLN;
- 7.3. **Dynamika transmisji wirusa BVD-MD, E/01/6.8**, międzynarodowy projekt wewnętrzny (IC) w ramach Network of Excellence for Epizootic Disease Diagnosis and Control, EPIZONE, FP6-2004-Food- 3-A, 2010-2011, PIWet-PIB, SLU Szwecja, SVA Szwecja, główny wykonawca (rola epidemiologa molekularnego, zaangażowana

w planowanie i przeprowadzenie zakażenia eksperymentalnego, badania laboratoryjne, analiza statystyczna, opracowanie publikacji, szkolenie i opieka naukowa nad dwoma studentami z Chin i Wielkiej Brytanii);

- 7.4. **Epidemiologia molekularna**, E/01/6.4, 6 Program Ramowy UE (EPIZONE) - FP6, 2008-2012, PIWet-PIB, Vet-DTU Dania, wykonawca;
- 7.5. **Opracowanie metody RT-PCR do diagnostyki zakażeń bydła atypowymi pestiwirusami**, S/112 (działalność statutowa), MNiSW, 2012-2013, PIWet-PIB, główny wykonawca;
- 7.6. **Zastosowanie metody real-time RT-PCR do wykrywania obecności materiału genetycznego wirusa BVD/MD w próbkach pobranych od bydła**, S/047 (działalność statutowa), MNiSW, 2010-2011, PIWet-PIB, wykonawca;
- 7.7. **Przydatność próbek pulowanych do badań serologicznych i wirusologicznych w kierunku wykrywania zakażeń wirusem biegunki bydła i choroby błon śluzowych (BVD-MD)**, S/089 (działalność statutowa), MNiSW, 2011-2012, PIWet-PIB, wykonawca;
- 7.8. **Dynamika zakażeń cieląt wirusem BVD-MD**, S/045 (działalność statutowa), MNiSW, 2010-2011, PIWet-PIB, wykonawca;
- 7.9. **Badania nad występowaniem zakażeń wirusem BRSV u buhajów w Polsce**, S/049 (działalność statutowa), MNiSW, 2008-2009, PIWet-PIB, wykonawca;
- 7.10. **Badanie trendów występowania gąbczastych encefalopatii u zwierząt w Polsce i w świecie**, W/127 (program wieloletni PIB), MNiSW, 2009-2013, główny wykonawca;
- 7.11. **Porównanie wybranych metod biologii molekularnej do różnicowania zakażeń powodowanych przez herpeswirus koni typ 1 (EHV-1) i 4 (EHV-4)**, S/111 (działalność statutowa), MNiSW, 2012-2013, PIWet-PIB, wykonawca.

8. Dorobek dydaktyczno-popularyzatorski

Sprawuję opiekę nad przebiegiem i realizacją pracy doktorskiej mgr Aleksandry Kuty w roli promotora pomocniczego. Prowadzę szkolenia i opracowuję instrukcje i materiały szkoleniowe dla lekarzy Inspekcji Weterynaryjnej i pracowników Zakładów Higieny Weterynaryjnej z zakresu diagnostyki chorób pionowych, a ostatnio z diagnostyki SBV. Ze względu na działalność referencyjną mojego zakładu prowadzę również wizyty kontrolne ZHW i przygotowuję raporty z tej działalności dla Głównego Lekarza Weterynarii. Prezentowałam również wyniki badań SBV w Polsce podczas spotkań Rady Sanitarno-

Epizootycznej przy GIW. W latach 2010-2011 r. prowadziłam wykłady i kolokwia podczas kursu diagnostyki wirusologicznej dla słuchaczy międzynarodowego studium między wydziałami SLU a Centrum Biomedycznym BMC na Uniwersytecie w Uppsali koordynowanego przez prof. Thomasa Linné. Jestem autorką popularno-naukowych publikacji w czasopismach: Życie Weterynaryjne, Magazyn Weterynaryjny, Bydło, Lecznica Dużych Zwierząt i Pies. Recenzowałam anglojęzyczne publikacje m.in. dla Journal of Clinical Microbiology (IF₂₀₁₁=4,153), Virology Journal (IF₂₀₁₁=2,340), Journal of Virological Methods (IF₂₀₁₁=2,011) i Genetics and Molecular Microbiology (IF₂₀₁₁=0,634). Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, a przez okres dwóch lat byłam również sekretarzem puławskiego oddziału PTNW. Kilkakrotnie prowadziłam wykłady naukowe na spotkaniach PTNW.

