

AUTOREFERAT

DR MARZENA ROLA-ŁUSZCZAK

ZAKŁAD BIOCHEMII

PAŃSTWOWY INSTYTUT WETERYNARYJNY-PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

Puławy, 2019

1. Imię i Nazwisko

Marzena Rola-Łuszczak

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

- 2003 - **doktor nauk weterynaryjnych**, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy (PIWet-PIB) w Puławach. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Opracowanie testu ELISA do diagnostyki zakażeń wirusem niedoboru odporności bydła oraz określenie wpływu tego wirusa na przebieg zakażenia wirusem białaczki bydła”, Promotor: Prof. dr hab. Jacek Kuźmak
- 1997- **magister biotechnologii**, na podstawie pracy magisterskiej pt.: „Lipopolisacharydy mutantów Tn5 *Rhizobium leguminosarum bv.trifolii* 24.1 o zmienionych właściwościach symbiotycznych”, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Promotor: Doc. dr hab. Maria Głowacka

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

- od 01.01.2004 – **adiunkt** - Zakład Biochemii, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach.
- od 01.05.2002 – **asystent** - Zakład Biochemii, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach.
- Od 01.10.1997 - **specjalista inżynierijno-techniczny biotechnolog**- Zakład Biochemii, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach.
- **staże zagraniczne:**
 - Cztery staże w Szkole Weterynaryjnej w Lyonie, Laboratorium INRA lentiwirusów małych przeżuwaczy (w sumie dziewięć miesięcy)
1999 – staż miesięczny - stypendium COST action 834
2000 – staż dwumiesięczny - program POLONIUM
2001 – staż trzymiesięczny – stypendium FEMS
2001/2002 – staż trzymiesięczny – program POLONIUM
 - Staż po doktorski - 26-miesięczny - (2004-2006) School of Biological Sciences, The Nebraska Center for Virology, University of Nebraska, Lincoln, USA
 - Staż dwutygodniowy- program EPIZONE, laboratorium CIRAD, Montpellier, Francja (marzec 2007)
 - Dwukrotny miesięczny staż w ramach programu BRITISH-POLISH YOUNG SCIENTISTS PROGRAMME, Veterinary Laboratories Agency (VLA), New Haw, Addlestone, Wielka Brytania, (listopad 2008 oraz październik 2009)

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.)

4a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Badania nad diagnostyką molekularną zakażeń wirusem białaczki oraz zmiennością genetyczną wirusa

4b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

H-1. Rola-Łuszczak M., Finnegan C., Olech M., Choudhury B., Kuźmak J.: Development of an improved real time PCR for the detection of bovine leukaemia provirus nucleic acid and its use in the clarification of inconclusive serological test results; Journal of Virological Methods, 2013, 189, 258-264. doi: 10.1016/j.jviromet (IF₂₀₁₃ 1,883; MNiSW₂₀₁₃ 20, liczba cytowań 7)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w: wykonaniu większości badań laboratoryjnych (zaprojektowanie starterów, sondy, przygotowanie standardu, walidacja metody, analiza próbek terenowych metodą real time PCR oraz nested PCR - 444pz, wykonanie porównania do testu real time PCR MGB), a następnie w opracowaniu wyników (wykonanie wykresów, tabel), pisaniu manuskryptu, autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

H-2. Jaworski J.P., Pluta A., Rola-Łuszczak M., McGowan S.L., Finnegan C., Heenemann K., Carignano H.A., Alvarez I., Murakami K., Willems L., Vahlenkamp T.W., Trono K.G., Choudhury B., Kuźmak J.: Interlaboratory Comparison of Six Real-Time PCR Assays for Detection of Bovine Leukemia Virus Proviral DNA. Journal of Clinical Microbiology. 2018 Jun 25;56(7). pii: e00304-18. doi: 10.1128/JCM.00304-18. Print 2018 Jul. (IF₂₀₁₇ 4,054 ; MNiSW 2013-2016 35, liczba cytowań 0)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w kolekcjonowaniu materiału, planowaniu badań, interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu i odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

H-3. Rola-Łuszczak M., Pluta A., Olech M., Donnik I., Petropavlovskiy M., Gerilovych A., Vinogradova I., Choudhury B., Kuźmak J.: The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny; PLoS ONE, 2013, 8(3):e58705. doi:10.1371/ journal. pone.0058705. (IF₂₀₁₃ 3,534 ; MNiSW₂₀₁₃ 40, liczba cytowań 31)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w: wykonaniu charakterystyki molekularnej większości izolatów BLV (kolekcjonowanie materiału, otrzymanie DNA, amplifikacja, przygotowanie produktów PCR do sekwencjonowania, analiza sekwencji i umieszczenie ich w bazie GenBank), opracowaniu wyników, przygotowaniu manuskryptu, autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

H-4. Rola-Łuszczak M., Grabowska A., Szewczyk B., Kuźmak J.: Baculovirus expression and potential diagnostic application of the gp51 envelope glycoprotein of genetic mutants of the bovine leukaemia virus *Journal of Veterinary Research* 2019, 63, 1-6 DOI:10.2478/jvetres-2019-0020 (IF₂₀₁₈ **0,811**; MNiSW 2013-2016 **20**, liczba cytowań **0**)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w: pozyskaniu środków na badania, zaplanowaniu badań, wykonaniu badań molekularnych (konstrukcja kasety ekspresyjnej dla wariantów i szczepu dzikiego, klonowanie to wektora transferowego pFastBac, transpozycja w komórkach bakteryjnych DH10Bac, otrzymanie bakmidowego DNA), wykonaniu badań serologicznych (opracowanie i wykonanie różnorodnych modeli testów ELISA), interpretacji wyników badań oraz przygotowaniu manuskryptu i odpowiedzi na uwagi recenzentów, autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

Łączna punktacja prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji:

- według listy Ministerstwa i Szkolnictwa Wyższego: **115 punktów**
- łączny *impact factor* wg listy JCR: **10,282**
- łączna liczba cytowani wg WoS Core Collection (z dn.15.04.2019): **38**

4c) omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wstęp

Enzootyczna białaczka bydła (EBB) jest chorobą nowotworową o wybitnie przewlekłym przebiegu, którą cechuje rozwój zmian proliferacyjnych układu limforetikularnego, prowadzący do przewlekłej limfocytozy tzw. forma leukemiczna i do zmian guzowatych w węzłach chłonnych i narządach wewnętrznych, co określa się jako formę guzowatą EBB. Czynnikiem etiologicznym jest wirus białaczki bydła (*Bovine leukemia virus-BLV*) zaliczany do rodziny *Retroviridae*, rodzaju *Deltaretrovirus*, gdzie jest klasyfikowany razem z wirusem ludzkiej białaczki T komórkowej (HTLV - *Human T-Cell Leukemia Virus*) (Gillet i wsp. 2007).

W przebiegu choroby wyróżniamy formę aleukemiczną, występująca u większości zakażonych zwierząt, dla której charakterystyczny jest brak objawów klinicznych, obecność swoistych przeciwciał i wirusowego DNA zintegrowanego w formie tzw. prowirusa z genomem komórek (Burny i wsp. 1988). Faza ta może trwać różnie długo, zwykle jednak po 12-16 miesiącach od zakażenia u około 30% osobników rozwija się forma subkliniczna EBB, dla której typowym objawem jest przewlekła limfocytoza, przy braku objawów klinicznych. Towarzyszy jej wzrost odsetka prolifimfocytów i limfoblastów, co związane jest z poliklonalną proliferacją limfocytów B

o fenotypie CD5+ IgM+ (Aida i wsp. 1993). Występowanie przewlekłej limfocytozy ma ścisły związek z obecnością określonych genów MHC klasy II, oznaczonym jako BoLA-DRB3 (Lewin i wsp. 1988). U około 5-10% zwierząt z formą subkliniczną, zwykle po kilku latach od zakażenia, rozwija się forma guzowata białaczki. Nieznany jest mechanizm leukomogenezy w przypadku EBB, lecz przypuszcza się, że jest to związane z obecnością genów regulatorowych w genomie BLV, kodujących białka Tax i Rex, aktywujących onkogeny, co prowadzi do dysregulacji funkcji układu immunologicznego (Rodriguez i wsp. 2011).

Występowanie EBB ma zasięg światowy, co należy łączyć z migracjami ludzi i zakażonego bydła na przełomie XIX i XX wieku, głównie z Europy do Ameryki Północnej oraz z późniejszymi przemieszczaniami bydła po II wojnie światowej, głównie w krajach europejskich oraz z USA do Ameryki Południowej, Australii i krajów Dalekiego Wschodu (Johnson R i Kancene J, 1992). Odsetek zakażonych osobników, notowany na podstawie dodatnich odczynów serologicznych, jest zróżnicowany w poszczególnych strefach geograficznych, wykazując najwyższe wartości (60% do 80%) w krajach Ameryki Północnej i Południowej (EFSA, AHAW Panel 2015). Najbardziej korzystna sytuacja epidemiologiczna notowana jest w Europie, gdzie większość krajów wspólnoty jest oficjalnie uznana za wolne od EBB, poza krajami bałkańskimi i niektórymi krajami Europy Środkowo-Wschodniej. Program rozpoczęty w 2007 r. doprowadził do uznania Polski za kraj urzędowo wolny od EBB, zgodnie z decyzją Komisji Europejskiej 2017/888 z 22 maja 2017 roku.

Enzootyczna białaczka bydła umieszczona jest na liście chorób podlegających obowiązkowi zwalczaniu. Ramy prawne zwalczania EBB reguluje załącznik D Dyrektywy Rady 64/432 oraz rozdział 11.9 Kodeksu Zdrowia Zwierząt Lądowych Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE). Prawodawstwo wielu krajów wypełnia założenia tych dokumentów w zakresie dotyczącym uzyskania i utrzymania statusu kraju lub regionu wolnego od EBB, co nakłada obowiązek usuwania ze stada wszystkich zwierząt reagujących dodatnio w testach diagnostycznych oraz konieczność przeprowadzania okresowych badań kontrolnych w celu potwierdzenia statusu wolnego od EBB. Postępowanie to, określane jako „*test and eliminate*” z powodzeniem było stosowane w wielu krajach europejskich, w tym w Polsce, jako efektywny sposób uwalniania stad od EBB (Nuotio i wsp. 2003, Acaite i wsp. 2007). Ujemną stroną takiego postępowania jest konieczność ponoszenia znacznych nakładów finansowych, związanych z wykupem i ubojem zakażonych zwierząt oraz wprowadzaniem nowych osobników do stada (Pollari i wsp. 1993). Jednak argumentem przemawiającym za stosowaniem takich programów zwalczania EBB jest fakt negatywnego wpływu zakażeń BLV na produktywność bydła, związanego z obniżoną produkcją mleka (Ott i wsp. 2003) oraz obniżoną reprodukcją (Bartlett i wsp. 2013). Nie bez znaczenia jest negatywny wpływ zakażeń BLV na niektóre parametry układu immunologicznego bydła (Blagitz i wsp. 2017) oraz większa podatność zakażonych zwierząt na współinfekcje innymi patogenami (Jacobs i wsp. 1995, Scott i wsp. 2006). Dodatkowo, badania przeprowadzone w ostatnich latach sugerują możliwy związek BLV z występowaniem raka piersi u kobiet (Buehring i wsp. 2014).

Ze względu na to, że programy zwalczania EBB bazują na identyfikowaniu i eliminowaniu bydła zakażonego BLV, kluczowe jest zatem stosowanie efektywnych metod diagnostycznych. Poznanie w 1969 roku BLV pozwoliło na wyprodukowanie swoistego antygeny i zastosowanie metod serologicznych w diagnostyce zakażeń BLV, spośród których metodami zalecanymi przez OIE są metoda immunodyfuzji w żelu (AGID) i metoda immunoenzymatyczna (ELISA) (Manual OIE, 2018).

W Polsce, podobnie jak w wielu innych krajach obserwuje się tendencję do szerokiego stosowania metody ELISA, ze względu na jej wysoką czułość, możliwość badania próbek pulowanych surowicy lub mleka oraz obiektywny odczyt wyników. Istotne, z praktycznego punktu widzenia, ograniczenia w stosowaniu tej techniki odnieść można do niskiego miana swoistych przeciwciał, związanego z wczesnym okresem po zakażeniu. Pewnym mankamentem metody ELISA jest też możliwość wystąpienia wyników fałszywie dodatnich (Reichel i wsp. 1998,). Za ich przyczynę powszechnie uważany jest wysoki, patologiczny poziom immunoglobulin w surowicy krwi, co spowodowane może być przewlektymi stanami zapalnymi, stosowaniem terapii bodźcowej, względnie szczepieniami (Moreno i wsp. 1990). Obserwowano tego rodzaju reakcje po szczepieniach przeciwko piropłazmozie i papilomatozie (Klintevall 1995). Fałszywie dodatnie wyniki mogą też być wynikiem obecności przeciwciał pochodzenia siałowego w surowicy krwi badanych cieląt (Ballagi-Pordany i wsp. 1992) oraz obecności tzw. przeciwciał heterofilnych, wiążących nieswoiście immunoglobuliny mysie, co ma krytyczne znaczenie w testach ELISA wykorzystujących monoklonalne przeciwciała.

Mając na uwadze takie ograniczenia testu ELISA w ostatnich latach opracowano metody pozwalające na bezpośrednie wykrywanie prowirusowego DNA u zakażonych zwierząt, w oparciu o technikę łańcuchowej reakcji polimerazy (*Polymerase Chain Reaction - PCR*). Metoda ta ujęta jest w przepisach OIE jako tzw. metoda alternatywna, uzupełniająca badanie serologiczne, zalecana do wykrycia prowirusowego DNA między innymi u cieląt, karmionych siałą zakażonych matek, do potwierdzenia obecności prowirusa w tuszach zwierząt, wykazujących zmiany wskazujące na EBB w trakcie badania poubojowego lub jako pomocna metoda w diagnostyce różnicowej EBB i białaczek sporadycznych, kiedy badanie histopatologiczne nie daje jednoznacznych rezultatów (Manual OIE 2018, Klintevall i wsp. 1993, Duncan i wsp. 2005). Do tej pory opracowano szereg metod takich jak nested PCR, PCR *in situ*, izotermiczna amplifikacja DNA (LAMP), CoCoMo-qPCR czy real time PCR, reprezentujących różny poziom czułości i swoistości, a także wykorzystujących geny *env*, *gag* i *pol*, jako matryce do amplifikacji (Eaves i wsp. 1994, Kubis i wsp. 2007, Komiyama i wsp. 2009, Jimba i wsp. 2012, Kuckleburg i wsp. 2003, Lew i wsp. 2004, Heenemann i wsp. 2012).

Jednak w opracowaniach tych nierozstrzygnięta pozostaje kwestia opracowania testu PCR przydatnego do wykrywania prowirusa u zwierząt wykazujących niejednoznaczne wyniki badań serologicznych w teście ELISA lub wyniki wzajemnie wykluczające się, kiedy do badań wykorzystywane są handlowe zestawy ELISA, reprezentujące różne warianty testu takie jak *indirect ELISA*, *double-well ELISA* czy *blocking ELISA*. Ma to szczególne znaczenie z punktu widzenia laboratoriów

referencyjnych, którym zadaniem jest potwierdzanie wątpliwych lub niejednoznacznych wyników badań, otrzymywanych przez laboratoria terenowe.

Badanie zmienności genetycznej izolatów terenowych BLV, szczególnie w skali ogólnoświatowej, jest aktualnie jednym z ważniejszych obszarów związanych z badaniami nad BLV i było przedmiotem licznych publikacji w ostatnich latach. Analiza dostępnych sekwencji BLV wskazuje na ich bardzo wysoki stopień homologii, co jest typowe dla wirusów rodzaju *Deltaretroviridae* (Mansky i Temin 1994). Badania wielu grup badaczy skupione były przede wszystkim na analizie sekwencji genu *env*, kodującego glikoproteinę powierzchniową gp51. Białko to odgrywa kluczową rolę w procesie replikacji wirusa. Zawiera ono ponadto epitopy konformacyjne indukujące syntezę przeciwciał neutralizujących oraz tzw. *receptor binding domain*, strukturę niezbędną do wiązania wirusa z receptorem na komórkach (Johnston i wsp. 2002). Efektem tych badań było poznanie sekwencji genu *env*, reprezentujących ponad 100 izolatów BLV z licznych krajów i prawie wszystkich kontynentów oraz przeprowadzenie licznych analiz filogenetycznych, potwierdzających występowanie aktualnie 10 genotypów BLV (Lee i wsp. 2016). Dane te w zakresie występowania genotypów G1, G2, G4, G6 i G9 zostały następnie potwierdzone poprzez badanie sekwencji całego genomu BLV techniką głębokiego sekwencjonowania (Polat i wsp. 2016). Generalnie, analiza filogenetyczna wykonywana tak precyzyjnymi narzędziami bioinformatycznymi jak metoda *maximum likelihood* czy *Bayesian inference* wykazała ścisły związek pomiędzy występowaniem poszczególnych genotypów, a ich geograficzną lokalizacją (Moratorio i wsp. 2010, Rodrigues i wsp. 2009). Obserwacje te zostały następnie potwierdzone w badaniach wskazujących na unikatową lokalizację genotypu G8 w Chorwacji (Balic i wsp. 2012), G9 w Boliwii (Polat i wsp. 2016) oraz genotypu G10 u bydła w Tajlandii (Lee i wsp. 2016).

Wyniki wielu grup badaczy wskazują na związek pomiędzy występowaniem mutacji punktowych w genach lub sekwencjach regulatorowych a cechami biologicznymi retrowirusów. Badania takie nabierają szczególnego znaczenia w przypadku genu *env* biorąc pod uwagę znaczenie białka ENV w replikacji wirusa i patogenezie zakażeń BLV. Do tej pory, w szeregu pracach, opisano liczne mutacje w genie *env*, skutkujące zmianami w sekwencji aminokwasowej białka gp51. Jakkolwiek, nie zanotowano bezpośredniego związku pomiędzy zakażeniami wywołanymi przez określone genotypy BLV a zmienioną odpowiedzią humoralną (Licursi i wsp. 2002, Asfaw i wsp. 2005), to fakt częstego występowania mutacji w epitopie G, mających charakter selekcji pozytywnej, może świadczyć o występowaniu mutantów BLV, indukujących syntezę przeciwciał o zmienionym powinowactwie niż te, indukowane przez szczepy nie wykazujące mutacji (Zhao i wsp. 2007). Można przyjąć, że podobnie jak w przypadku wirusa ludzkiej białaczki T komórkowej zmiany aminokwasów w obrębie poszczególnych epitopów białka gp51 indukować mogą odpowiedź humoralną, specyficzną dla danych wariantów genetycznych (Tallet i wsp. 2001). Ponadto, podobnie jak w przypadku zmian w epitopach konformacyjnych, notowano szereg mutacji występujących w domenach neutralizujących i sekwencjach kodujących receptory dla limfocytów CD4 i CD8 (Dube i wsp. 2009), co w oczywisty sposób moduluje odpowiedź gospodarza na zakażenie takimi wariantami wirusa.

Dlatego wydaje się, że badanie zmienności genetycznej izolatów terenowych BLV jest niezwykle ważne, biorąc pod uwagę światowy zasięg występowania wirusa. Analiza filogenetyczna oraz badania nad występowaniem nowych genotypów lub subgenotypów BLV, typowych dla określonych regionów geograficznych, otwierają nowe możliwości w obszarze epidemiologii molekularnej. Analiza mutacji w genie *env* może potwierdzić istnienie zjawiska ucieczki wirusa spod kontroli układu immunologicznego, a także określić znaczenie tych mutacji dla efektywności diagnostyki serologicznej oraz stworzyć możliwości opracowania nowych testów diagnostycznych wykrywających zakażenia indukowane wariantami genetycznymi. Nie bez znaczenia jest także fakt możliwego wykazania związku tych mutacji z nowymi cechami biologicznymi BLV.

Cel badań

Badania przedstawione w publikacjach stanowiących omawiane osiągnięcie naukowe skupione były na dwóch głównych celach:

1. Opracowaniu techniki real time PCR do wykrywania prowirusowego DNA BLV w leukocytach krwi bydła, szczególnie w odniesieniu do osobników wykazujących niejednoznaczne wyniki w badaniach serologicznych (ELISA) oraz porównaniu tej techniki wobec testów, opracowanych przez inne laboratoria.
2. Analizie zmienności genetycznej izolatów terenowych BLV występujących u bydła w Polsce, Białorusi, Ukrainie i Rosji oraz otrzymaniu rekombinowanych białek gp51 w systemie bakulowirusowym, reprezentujących warianty genetyczne BLV.

Badania przedstawione w publikacjach stanowiących omawiane osiągnięcie naukowe zostały wykonane w ramach projektu British Council (Young Scientist Program, WAR/342/124), grantu MNiSW 2 PO4B 009 27 oraz w ramach aktywności laboratorium referencyjnego ds. enzootycznej białaczki bydła Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE).

Omówienie wyników prac wskazanych jako szczególne osiągnięcie naukowe

H-1. Rola-Łuszczak M., Finnegan C., Olech M., Choudhury B., Kuźmak J.: Development of an improved real time PCR for the detection of bovine leukaemia provirus nucleic acid and its use in the clarification of inconclusive serological test results; *Journal of Virological Methods*, 2013, 189 258-264. doi: 10.1016/j.jviromet

Celem pracy było opracowanie techniki real time PCR przydatnej do wykrywania prowirusowego DNA BLV w leukocytach krwi bydła wykazującego niejednoznaczne wyniki badań serologicznych w teście ELISA. Dysponowanie taką techniką, szczególnie przez krajowe laboratoria referencyjne, jest istotne biorąc pod uwagę konieczność potwierdzania wyników otrzymywanych przez laboratoria terenowe oraz z drugiej strony, istnienie pewnych ograniczeń w stosowaniu testów ELISA, co wynika z niskiej

zawartości przeciwciał w określonych próbkach surowicy czy też podejrzenia wyników fałszywie dodatnich na skutek reakcji nieswoistych.

Metodę real time PCR oparto o wykorzystanie sondy typu TaqMan, a jej sekwencję oraz sekwencje starterów opracowano w oparciu o programy *Primer3* i BLAST. Istotnym elementem opracowania testu było przygotowanie standardu DNA poprzez amplifikację fragmentu 120 pz z obszaru genu *pol*, jego klonowanie w plazmidzie pST-Blue1, zlinearyzowanie poprzez trawienie enzymem restrykcyjnym *Pst*I i użycie różnych rozcieńczeń plazmidowego DNA. Dodatkowo do walidacji testu wykorzystano panel 19 próbek DNA, dodatnich i ujemnych, uprzednio badanych przez laboratoria referencyjne OIE. Wyniki odnoszące się do analitycznej czułości testu wykazały, że limit wykrywalności opracowanej metody wynosi 10^0 kopii oraz iż istnieje silna zależność liniowa pomiędzy wartościami C_t a różnymi rozcieńczeniami kontrolnego DNA (współczynnik korelacji $r=0,992$) przy zachowanych parametrach dotyczących efektywności amplifikacji (od 97,3% do 107,7%). Badanie próbek referencyjnego DNA, uwzględniające próbki ujemne i dodatnie, o różnej liczbie kopii, potwierdziło spodziewany stopień swoistości i specyficzności metody.

W badaniach mających na celu ocenę zdolności metody real time PCR do weryfikacji wyników badań serologicznych w teście ELISA istotny był dobór odpowiednich próbek. Wykorzystano 51 próbek genomowego DNA wyizolowanego z leukocytów krwi bydła, w tym 46 pochodzących od krów ze stad uznanych za wolne od EBB, jednak zakwalifikowanych przez laboratoria terenowe jako dodatnie na podstawie badania testami ELISA oraz 5 wykazujących niejednoznacznie lub wątpliwe wyniki, kiedy badano je różnymi testami ELISA. Dodatkowo badano 6 próbek DNA uzyskanych z węzłów chłonnych bydła, wykazujących w trakcie badania poubojowego zmiany wskazujące na EBB. Próbki DNA badano także przy użyciu trzech konwencjonalnych metod PCR, amplifikujących fragmenty genu *env* i LTR. Uzyskane wyniki potwierdziły występowanie prowirusa metodą real time PCR u 28 krów, które również były dodatnie w teście ELISA. Takie wyniki potwierdzono jedynie u 17 osobników badanych konwencjonalną techniką PCR (liczba kopii od 7 do 20000), ponieważ w pozostałych próbkach technika ta wykazała wyniki niespójne (liczba kopii poniżej 7). W próbkach DNA od 23 krów, które okazały się ujemne w teście ELISA, badanie 4 z nich wykazało C_t korespondujące z minimalną liczbą kopii prowirusa (mniej niż 1), co było podstawą do przeprowadzenia reakcji real time PCR w pięciu powtórzeniach, celem określenia limitu wykrywalności dla metody. Uzyskane dane potwierdziły wynik dodatni w 3/5 reakcji, potwierdzając obecność prowirusowego DNA. Badanie 6 próbek DNA izolowanego z węzłów chłonnych potwierdziło obecność prowirusa w dwóch próbkach, przy niskiej liczbie kopii wahającej się od 2,7 do 1,9 na 500 ng genomowego DNA.

Uzyskane wyniki potwierdziły wyższą czułość metody real time PCR w porównaniu do klasycznego PCR oraz wskazały na ścisłą zależność pomiędzy wykrywalnością prowirusa a liczbą kopii. Potwierdziły też, że opracowana technika real time może być wykorzystywana do potwierdzania stanu zakażenia wirusem białaczki u osobników, kiedy wyniki badań serologicznych są niejednoznaczne lub kiedy do badania dostępne są tylko próbki DNA izolowane z tkanek.

H-2. Jaworski J.P., Pluta A., Rola-Łuszczak M., McGowan S.L., Finnegan C., Heenemann K., Carignano H.A., Alvarez I., Murakami K., Willems L., Vahlenkamp T.W., Trono K.G., Choudhury B., Kuźmak J.: Interlaboratory Comparison of Six Real-Time PCR Assays for Detection of Bovine Leukemia Virus Proviral DNA. *Journal of Clinical Microbiology* 2018 Jun 25;56(7). pii: e00304-18. doi: 10.1128/JCM.00304-18. Print 2018 Jul.

Opracowanie w ostatnich latach szeregu testów wykrywających prowirusowy DNA BLV, opartych na metodzie real time PCR, rodzi szereg pytań o ich możliwości diagnostyczne w kontekście walidacji i standaryzacji takich testów. Fakt ogólnoświatowego występowania zakażeń BLV oraz znaczny wzrost obrotu zwierzętami i produktami zwierzęcego pochodzenia, co jest jednym z elementów globalizacji handlu, narzuca konieczność harmonizacji metod diagnostycznych. Znalazło to odzwierciedlenie w szeregu wytycznych OIE, wskazujących na potrzebę międzynarodowej harmonizacji metod diagnostycznych, szczególnie tych odnoszących się do chorób o ważnym znaczeniu gospodarczym.

W omawianej pracy podjęto próbę oceny zdolności wykrywania prowirusowego DNA BLV przez sześć testów opartych na metodzie real time PCR, opracowanych względnie wykorzystywanych w laboratoriach referencyjnych OIE w Polsce, Niemczech i Anglii oraz w laboratoriach diagnostycznych w Argentynie, Japonii i Belgii. Laboratoria te wykorzystywały testy oparte o metodę real time PCR, wykorzystując sondę molekularną typu TaqMan bądź bazując na właściwościach fluorescencyjnych barwników interkalujących SYBR lub MESA Green, a amplifikowany fragment zlokalizowany był głównie w genie *pol* i *tax* (test opracowany w Japonii). Dla badań porównawczych kluczowy był dobór próbek DNA, przygotowanych przez laboratorium w PIWet-PIB, które w liczbie 58 pochodziły od zakażonych krów z różnych krajów: Ukrainy, Rosji, Mołdawii, Chorwacji, Japonii, Argentyny i Polski. Jakość DNA oceniono w oparciu o analizę liczby kopii genu referencyjnego *H3F3A* testem real time PCR i wykazano, że wartości te były znormalizowane i nie odbiegały od normy (test Grubbsa). Dodatkowo, analiza testem *t* potwierdziła ich stabilność poprzez brak różnic w liczbie kopii w próbkach poddanych przechowywaniu w 4°C, przez okres 21 dni. Próbkę te następnie wysłano do wszystkich współpracujących laboratoriów, w celu określenia liczby kopii prowirusa, wykorzystując testy real time PCR, zgodnie z obowiązującymi w tych laboratoriach protokołami.

Uzyskane wyniki wykazały, że najwyższą czułość diagnostyczną (98% i 93%) wykazały testy oparte o tę samą metodę (opisaną w publikacji nr 1), stosowaną przez laboratorium w Anglii i Polsce. Czułość pozostałych testów wahała się od 86% do 56%. Analiza zgodności wyników pomiędzy poszczególnymi laboratoriami potwierdziła też najwyższą zgodność (94,8%, współczynnik kappa=0,549) pomiędzy laboratoriami w Polsce i Anglii, jakkolwiek zgodność ta była niższa dla laboratorium w Argentynie, wykorzystującego ten sam układ starterów, jednak wykorzystując barwnik SYBR Green. Potwierdza to wyższą wartość diagnostyczną technik real time z sondami typu TaqMan. Analiza wyników wykazała też, że spośród 58 próbek wyniki zgodne zanotowano w 34

przypadkach, a wyniki niezgodne w 24. Dlatego w kolejnym etapie badań podjęto próbę zinterpretowania tych różnic, odnosząc je do możliwych zmian w sekwencjach nukleotydowych, wykorzystywanych jako sekwencje starterów i sekwencje sond. W tym celu 74 sekwencje BLV dostępne z bazy GenBank, reprezentujące genotypy G1, G2, G3, G4, G6, G9 i G10, zostały użyte do analizy tzw. *multiple-sequence alignment*, dostępnej w programie MAFFT. Analiza ta wykazała, że gen *tax* wykazał mniejszą zmienność niż gen *pol*. Dodatkowo ocena zmienności tych genów, wykonana poprzez analizę stopnia entropii Shannona wykazała, że miejsca wiązania starterów i sond znajdują się w wysoce konserwatywnych regionach. Zatem powyższe różnice pomiędzy testami nie miały źródła w zmienności sekwencji wirusa. W kolejnym etapie badań oceniano możliwość wykrycia liczby kopii prowirusowego DNA. W grupie próbek dających wyniki zgodne, średnia liczba kopii wynosiła 20310, podczas gdy w próbkach wykazujących wyniki rozbieżne liczba ta wynosiła 902. W tej grupie próbek, wysoki odsetek próbek (31%) z niską liczbą kopii (mniej niż 20) był elementem decydującym o różnym poziomie zgodności testów i różnicach w ich czułości diagnostycznej. Wysoka czułość wykazana dla testu wykorzystywanego w laboratorium w PIWet oraz w Anglii (APHA, Weybridge) potwierdza zdolność tego testu do identyfikowania próbek z niską liczbą kopii prowirusa.

Wyniki te, jak i rezultaty opisane w publikacji nr H-1 były podstawą do zaakceptowania tej techniki przez Komisję Norm i Preparatów OIE, jako testu zalecanego do diagnostyki EBB i opisanie jej w ostatnim wydaniu podręcznika *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, OIE 2018, rozdział 3.4.9. Enzootic Bovine Leukosis*.

H-3. Rola-Łuszczak M., Pluta A., Olech M., Donnik I., Petropavlovskiy M., Gerilovych A., Vinogradova I., Choudhury B., Kuźmak J.: The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny; PLoS ONE, 2013, 8(3):e58705. doi:10.1371/ journal. pone.0058705.

Celem pracy była szeroko rozumiana analiza zmienności genetycznej izolatów terenowych wirusa enzoptycznej białaczki bydła występujących u zakażonego bydła w krajach Europy Środkowo-Wschodniej i Syberii. Badanie zmienności genetycznej BLV, szczególnie w odniesieniu do kontekstu geograficznego, jest istotnym zagadnieniem, mającym związek z usprawnieniem diagnostyki serologicznej i molekularnej zakażeń, molekularną epidemiologią oraz lepszym poznaniem zjawiska ewolucji wirusa w kierunku powstawania form o nowych cechach biologicznych.

Do badań użyto 44 próbki genomowego DNA, wyizolowane z leukocytów krwi bydła z potwierdzoną obecnością przeciwciał dla BLV, pochodzącego z czterech krajów: Polski (18 próbek), Ukrainy (9), Białorusi (2) i Rosji (15 próbek). Przy użyciu metody nested PCR amplifikowano fragment długości 444 pz, zlokalizowany w końcu 5' genu *env* BLV i po oczyszczeniu produktów amplifikacji poddawano je sekwencjonowaniu metodą Sanger. Otrzymane sekwencje analizowano wstępnie przy pomocy programu BioEdit a 44 właściwe sekwencje konsensusowe otrzymano w programie Geneious. Ich

analiza przebiegała kilkutorowo i dotyczyła analizy filogenetycznej i oceny stopnia zmienności genetycznej na poziomie nukleotydowym i aminokwasowym.

Do porównania otrzymanych 44 sekwencji i analizy filogenetycznej użyto dodatkowo 40 sekwencji reprezentujących 8 ówczynie znanych genotypów, dostępnych z bazy GenBank oraz wykorzystano dwie metody (Neighbour-Joining i metodę Bayesa). Wybór tej drugiej metody, która uwzględnia szacowanie ryzyka błędu i przedstawia wyniki w oparciu o wyliczone wartości prawdopodobieństwa (prawdopodobieństwo *a posteriori*), podyktowany był potrzebą walidacji danych otrzymanych w metodzie Neighbour-Joining. Analiza filogenetyczna wykazała afiliację 15 sekwencji do genotypu G7, 25 sekwencji do genotypu G4 oraz przynależność czterech sekwencji z Ukrainy do nowego genotypu G8, który do tej pory był identyfikowany tylko w Chorwacji. Dalsza analiza, poparta wysokimi wartościami wsparcia dla danego węzła (*bootstrap*) i wysokimi wartościami prawdopodobieństwa *a posteriori* w metodzie Bayesa, wykazała przynależność tych izolatów do odrębnych podgrup G7A, G7B, G7C, grupujących izolaty wyłącznie z Rosji, Ukrainy i Polski. Analogicznie, w genotypie G4 większość izolatów można było pogrupować w obrębie dwóch podgrup G4A i G4B, które zawierają wyłącznie izolaty z Polski, ze ściśle geograficznie określonych regionów. Dane te, potwierdzające afiliację badanych izolatów do genotypów G4 i G7 są pierwszymi tego typu badaniami dla krajów Europy Środkowo-Wschodniej i Zachodniej Syberii i podkreślają w pewien sposób występowanie tych genotypów w obrębie krajów europejskich, co wcześniej było potwierdzone jedynie dla obszaru Europy Zachodniej. Niewątpliwym osiągnięciem tych badań jest potwierdzenie występowania odrębnych genetycznie podgrup, grupujących izolaty ze ściśle określonych geograficznie miejsc, co stwarza dogodne warunki do stosowania takiej analizy jako narzędzia w molekularnej epidemiologii.

Ocena stopnia zmienności genetycznej na poziomie nukleotydowym, wykazała wartości 3,1% i 2,8% dla genotypu G7 i G4 dla izolatów przez nas pozyskanych. Zmiany te zostały odzwierciedlone w badaniach sekwencji aminokwasowych białka gp51 badanych izolatów. Dla fragmentu środkowej części glikoproteiny gp51, która była przedmiotem tej analizy, ogółem zanotowano występowanie 21 substytucji aminokwasowych. Chociaż większość z nich występowała pojedynczo, w poszczególnych izolatach, cztery zmiany (arginina na histydynę w pozycji 121, histydyna na argininę w pozycji 142, izoleucyna na treoninę w pozycji 144, i izoleucyna na leucynę w pozycji 176) występowały u licznych izolatów. Istotnym jest fakt, że zmiany te dotyczyły ważnych epitopów na białku gp51 takich jak część epitopu konformacyjnego G, domeny ND2, indukującej przeciwciała neutralizacyjne czy peptydu wiążącego jony cynku, co jest warunkiem łączenia się wirusa z receptorami komórki. Co więcej, 71% wszystkich substytucji aminokwasowych nigdy wcześniej nie było notowanych w innych izolatach BLV, z innych odległych geograficznie regionów. Analiza tych zmian może określić nowe kierunki badań związane z badaniem znaczenia tych mutacji np. w procesie ucieczki BLV spod kontroli układu immunologicznego.

H-4. Rola-Łuszczak M., Grabowska A., Szewczyk B., Kuźmak J.: Baculovirus expression and potential diagnostic application of the gp51 envelope glycoprotein of

genetic mutants of the bovine leukaemia virus Journal of Veterinary Research 2019, 63, 1-6, DOI:10.2478/jvetres-2019-0020

Celem pracy było otrzymanie w systemie bakulowirusowym, rekombinowanych białek glikoproteiny gp51, reprezentujących warianty genetyczne BLV, charakteryzujące się zmianami w obrębie epitopów konformacyjnych G i H na tym białku. Punktem wyjścia dla tych badań było zidentyfikowanie, w oparciu o badanie metodą SSCP (*single strand conformation polymorphism* - polimorfizm konformacyjny pojedynczych nici DNA) trzech wariantów BLV (prowirusa) w DNA izolowanym z leukocytów krwi zakażonych krów, jednak nie wykazujących obecności przeciwciał. Analiza sekwencji prowirusowego DNA wykazała obecność mutacji dotyczących epitopów G i H, które determinowały zmieniony fenotyp wariantu wirusa w stosunku do szczepu dzikiego BLV. Na tej podstawie zidentyfikowano trzy warianty: #317 o fenotypie (G-H-GG-G-), #306 o fenotypie (G+H-GG-G-) i #18 o fenotypie (G-H+GG-G-). DNA z leukocytów była z obecnością powyższych wariantów został użyty do badań.

Pierwszym etapem badań było otrzymanie plazmidów chimer zawierających fragmenty genu *env*, kodujące epitopy danych wariantów BLV. W tym celu w pierwszym etapie fragment genu *env*, długości 903 pz amplifikowano metodą PCR z DNA wyizolowanego z hodowli komórkowej FLK, zakażonej dzikim szczepem i sklonowano go do wektora plazmidowego pCR-Blunt, tworząc w ten sposób tzw. kasetę ekspresyjną. Równolegle, metodą PCR, przy użyciu primerów z dodatkowymi miejscami restrykcyjnymi dla enzymów *AvrII* i *BglIII*, amplifikowano fragmenty długości 146 pz, kodujące region genu *env*, obejmujący epitopy G i H poszczególnych wariantów. W kolejnym etapie produkty amplifikacji trawiono endonukleazami *AvrII* i *BglIII* i subklonowano do kasety ekspresyjnej, uprzednio pozbawionej fragmentu *AvrII* / *BglIII*. Otrzymano w ten sposób trzy plazmidy chimery zawierające sekwencje BLV, odpowiadające wariantom BLV. W kolejnym etapie fragmenty 903 pz z plazmidów pCR-Blunt 317, 306 i 18 klonowano do bakulowirusowego wektora transferowego pFastBac1, wprowadzono go do bakterii *E.coli* szczep DH10Bac, zbierano rekombinowane bakmidy i transfekowano nimi komórki owadzie Sf9, produkujące następnie rekombinowane bakulowirusy. Istotną częścią badań było potwierdzenie ekspresji rekombinowanych białek gp51 BLV przez komórki Sf9 testem immunoperoksydazowym (IPMA), przy użyciu przeciwciał monoklonalnych dla epitopu DD'. Metodą western blot-ECL, przy użyciu tych samych przeciwciał potwierdzono obecność glikoproteiny gp51 we frakcji cytoplazmatycznej i błonowej komórek Sf9 jak i w supernatancie z nad ich hodowli. Ten ostatni element został wykorzystany do opracowania testu ELISA, wykorzystującego jako antygen diagnostyczny rekombinowane białka wariantów genetycznych BLV oraz antygen przygotowany na bazie szczepu dzikiego. W reakcji z autologicznymi surowicami, uzyskanymi od osobników zakażonych odpowiednimi wariantami oraz z surowicą kontrolną uzyskaną od zwierzęcia zakażonego szczepem dzikim BLV uzyskano wyniki potwierdzające wysoki stopień reaktywności tych antygenów.

Uzyskanie rekombinowanych białek gp51 BLV, reprezentujących warianty genetyczne wirusa, otwiera nowe możliwości konstrukcji testów ELISA do badania zakażeń wywoływanych takimi wariantami. Uzyskane białka mogą też być wykorzystane

jako antygen do otrzymywania monoklonalnych przeciwciał dla epitopów BLV, reprezentujących fenotyp innym niż szczep dziki.

W podsumowaniu do najważniejszych osiągnięć rozprawy habilitacyjnej zaliczam:

1. Opracowanie testu real-time PCR BLV przydatnego do wykrywania prowirusowego DNA wirusa enzootycznej białaczki bydła celem potwierdzenia stanu zakażenia ze szczególnym uwzględnieniem zwierząt wykazujących niejednoznaczne wyniki badań serologicznych w teście ELISA. Ma to szczególne znaczenie z punktu widzenia laboratoriów referencyjnych, których zadaniem jest potwierdzanie wątpliwych lub niejednoznacznych wyników badań, otrzymywanych przez laboratoria terenowe (H-1).
2. Umożliwienie wykrywania zakażeń BLV z bardzo wysoką czułością, w krótkim czasie i przy zminimalizowanym ryzyku kontaminacji próbek. Przeprowadzone badania międzylaboratoryjne wykazały, że opracowany test real-time PCR BLV jest jednym z najczulszych opisywanych w literaturze światowej (H-1, H-2).
3. Praktyczne znaczenie opracowanej metody real-time PCR BLV w diagnostyce BLV. Jest ona zalecana jako test uzupełniający do diagnostyki EBB i została opisana w ostatnim wydaniu podręcznika *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, OIE 2018, rozdział *Enzootic bovine leukosis*.
4. Analiza licznej grupy 44 sekwencji genu *env* reprezentujących izolaty BLV występujących u bydła w Polsce, Rosji, Ukrainie i Białorusi ugruntowała dotychczas obowiązującą klasyfikację BLV, poszerzając dostępność unikalnych sekwencji reprezentujących genotyp 7 i 8 wirusa (H-3). Praca ta była swego rodzaju pionierem badań prowadzonych w takim zakresie, a liczba publikacji w tej tematyce intensywnie wrasta od czasu jej ukazania.
5. Wykazanie częstego występowania mutacji w konformacyjnym epitopie G oraz określenie znaczenia tych mutacji dla efektywności diagnostyki serologicznej. Próbkę opracowania nowych testów wykrywających zakażenia indukowane wariantami genetycznymi podjęto dla trzech wariantów BLV pochodzących od bydła naturalnie zakażonego, a nie wykazującego odpowiedzi serologicznej na antygen gp51. Bazując na sekwencji DNA genu *env* wariantów BLV, otrzymano rekombinowany antygen diagnostyczny w systemie bakulowirusowym i opracowano testy ELISA. Uzyskano wyniki potwierdzające wysoki stopień reaktywności tych antygenów z surowicami homologicznymi oraz z surowicą kontrolną, co otwiera możliwość konstrukcji nowych testów ELISA do badania zakażeń wywoływanych wariantami BLV (H-4).

W ocenie osiągnięcia habilitacyjnego nie bez znaczenia pozostaje fakt, wyróżnienia opracowanego testu real-time PCR BLV i jego aplikacyjnego charakteru nagrodą Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi za osiągnięcia w zakresie postępu w rolnictwie, rozwoju wsi, rynkach rolnych i rybołówstwie

a także uhonorowanie poszczególnych publikacji nagrodami przyznawanymi przez Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych oraz Dyrektora PIWet-PIB.

Piśmiennictwo

- Gillet N., Florins A., Boxus M., Burteau C., Nogro A., Vandermeers F., Balon H., Bouzar A., Defoiche J, Burny A, Reichert M, Kettmann R, Willems L.: Mechanizms of leukomogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 2007, 16, 4-18.
- Burny D., Cleuter Y., Kettmann R., Mammerickx M., Marbaix G., Portetelle D., van der Broeke A., Willems L., Thomas R. Bovine leukemia: Facts and hypothesis derived from the study of an infectious cancer. *Vet. Microbiol.* 1988, 17, 197-218.
- Aida Y., Okada K., Amanuma H. Phenotype and ontogeny of cells carrying a tumor-associated antigen that is expressed on bovine leukemia virus-induced lymphosarcoma. *Cancer Res.* 1993, 53, 429-437.
- Lewin H., Wu M., Steward J., Nolan T. Association between BoLA and subclinical bovine leukemia virus infection in a herd of Holstein-Friesian cows. *Immunogenetics* 1988, 27, 338-344.
- Rodrigues S., Florins A., Gillet N., Brogniez A., Sanchez-Alcaraz M., Boxus M., Boulanger F., Gutierrez G., Trono K., Alvarez I., Vagnoni L., Willems L. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses* 2011, 3, 1210-1248.
- Johnson R., Kaneene J. Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leucosis. *Vet. Bulletin* 1992, 62, 287-306.
- European Food Safety Authority, Panel on animal Health and Welfare, Scientific opinion on enzootic bovine leucosis. *EFSA Journal* 2015, 13, 4188-4251.
- Nuotio L., Rusanen H., Sihvonen L., Neuvonen E., Eradication of enzootic bovine leucosis from Finland. *Prev. Vet. Med.* 2003, 59, 43-49.
- Acaite J., Tomosiunas V., Lukauskas K., Milius J., Pieskus J. The eradication experience of enzootic bovine leucosis from Lithuania. *Prev. Vet. Med.* 2007, 82, 83-89.
- Pollari F., DiGiacomo R., Evermann J. Use of survival analysis to compare cull rates between bovine leukemia virus seropositive and seronegative dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 1993, 54, 1400-1403.
- Ott S., Johnson R., Wells S. association between bovine –leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Prev. Vet. Med.* 2003, 61, 249-262.
- Bartlett P., Norby B., Byrem T., Parmelee A., Ledergerber J., Erskine R. Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *J. Dairy Science* 2013, 96, 1591-1597.
- Blagitz M., Souza F., Batista C., azevedo L., Sanchez E., Diniz S., Silva M., Haddad J., Della Libera A. Immunological implications of bovine leukemia virus infection. *Res. Vet. Science* 2017, 114, 109-116.
- Jacobs R., Pollari F., McNab W., Jefferson B. A serological survey of bovine syncytial virus in Ontario: associations with bovine leukemia virus and immunodeficiency-like viruses, production records, and management practices. *Can. J. Vet. Res.* 1995, 59, 271-278.
- Scott H., Sorensen O., Wu J., Chow E., Manninen K., Van Leeuwen J. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, *Neospora caninum*, Bovine leukemia virus, and Bovine viral diarrhea virus infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity. *Can. J. Vet. Res.* 2006, 47, 981-991.
- Buehring G., Shen H., Jensen H., Choi K., Sun D., Nuovo G. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. *Emerging Inf. Diseases* 2014, 20, 772-782.
- OIE 2018. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE 2018. Available online: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- Reichel M., Tham K., Barnes S., Kittelberger R. Evaluation of alternative methods for the detection of bovine leukaemia virus in cattle. *New Zealand vet. J.* 1998, 46, 140-146.
- Moreno E., Dolz G., Bonilla J., Jiménez C., Rodríguez L., Salazar L., Ramírez M., Bolaños E., Mora M., Silva S. Serological studies of Bovine leukaemia virus (BLV) infections in Costa Rica by ELISA, immunodiffusion and Western blotting. In: Regional Network of Latin America on Animal Disease Diagnosis Using Immunoassay and Labelled DNA Probe Techniques. Joint FAO/IAEA Division, Vienna, Austria, 1992, 99–144.

- Klintevall K. Bovine leukemia virus: course of infection and means of detection. Dissertation, Uppsala, Sweden, 1995.
- Ballagi-Pordany A., Klintevall K., Merz M., Klingeborn B., sandor B. Direct detection of bovine leukemia virus infection: practical applicability of a double polymerase chain reaction. *J.Vet.Med.B* 1992, 39, 69-77.
- Klintevall K., Berg A., Svedlund G., Ballagi-Pordany A., Belak S. Differentiation between enzootic and sporadic bovine leucosis by the use of serological and virological methods. *Vet. Rec.* 1993, 133, 272
- Duncan R., Scarratt W., Buehring G. Detection of Bovine Leukemia Virus by in Situ Polymerase Chain Reaction in Tissues from a Heifer Diagnosed with Sporadic Thymic Lymphosarcoma. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2005, 17, 190-194.
- Eaves F., Molloy J., Dimmock C., Eaves L. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of Bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. *Vet. Microbiol.* 2004, 39, 313–321.
- Kubis P, Szczotka M and Kuzmak J. Detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in paraffin sections, tissue smears, and peripheral blood leukocytes by in situ PCR. *Bull. Vet. Inst. Pulawy,* 2007, 51, 337-341.
- Komiyama C., Suzuki K., Miura Y., Sentsui, H. Development of loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis of Bovine leukemia virus infection. *J. Virol. Methods* 2009, 157, 175–179.
- Jimba M., Takeshima S., Murakami H., Kohara J., Kobayashi, N., Matsushashi T., Ohmori T., Nunoya T., Aida Y. BLV-CoCoMo-qPCR: a useful tool for evaluating bovine leukemia virus infection status. *BMC Vet. Res.* 2012, 6, 167.
- Kuckleburg C., Chase C., Nelson E., Marras S., Dammen M., Christopher- Hennings J. Detection of Bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reactions. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2003, 15, 72–76.
- Lew A., Bock R., Molloy J., Minchin C., Robinson S., Steer P. Sensitive and specific detection of proviral Bovine leukemia virus by 5' Taq nuclease PCR using a 3' minor groove binder fluorogenic probe. *J. Virol. Methods* 2004, 115, 167–175.
- Heenemann K., Lapp S., Teifke, J., Fichtner D., Mettenleiter, T., Vahlenkamp T. Development of a Bovine leukemia virus polymerase gene-based realtime polymerase chain reaction and comparison with an envelope gene-based assay. *J Vet Diagn Invest.* 2012, 24, 649–655.
- Mansky L. Temin H. Lower mutation rate of bovine leukemia virus relative to that of spleen necrosis virus. *J Virol.* 1994, 68, 494–499.
- Johnston E., Albritton L., Radke K. Envelope proteins containing single amino acid substitutions support a structural model of the receptor - binding domain of bovine leukemia virus. *J. Virol.* 2002, 76, 10861–10872.
- Lee E., Kim E., Ratthanophart J., Vitoonpong R., Kim B., Cho I., Song J., Lee K., Shin Y. Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle. *Infect. Genet. Evol.* 2016, 41, 245–54.
- Polat M., Takeshima S., Hosomichi K., Kim J., Miyasaka T., Yamada K., Arainga M., Murakami T., Matsumoto Y., de la Barra Diaz V., Panei C., González E., Kanemaki M, Onuma M, Giovambattista G, Aida Y. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. *Retrovirology,* 2016, 13, 4.
- Moratorio G., Obal G., Dubra A., Correa A., Bianchi S., Buschiazzo A., Cristina J., Pritsch O. Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. *Arch. Virol.* 2016, 155, 481–489.
- Rodriguez S., Golemba M., Campos R., Trono K., Jones L. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades. *J Gen Virol.* 2009, 90, 2788–2797.
- Balic D., Lojkic I., Periskic M., Bedekovic T., Jungic A., Lemo N., Roic B., Cac Z., Barbic L., Madic J. Identification of a new genotype of bovine leukemia virus. *Arch. Virol.* 2012, 157, 1281–1290.
- Licursi M., Inoshima Y., Wu D., Yokoyama T., Gonzalez E. Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts. *Virus Res.,* 2002, 86, 101–110.
- Asfaw Y., Tsuduku S., Konishi M., Murakami K., Tsuboi T, Wu D., sentsui H. Distribution and superinfection of bovine leukemia virus genotypes in Japan. *Arch. Virol.,* 2005, 150, 493–505.

- Zhao X., Buehring G. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: possible effects of selection and escape. *Virology*, 2007, 366, 150–165.
- Tallet B., Astier-Gin T., Moynet D., Londos-Gagliardi D., Guillemain B. Sequence variations in the amino- and carboxy-terminal parts of the surface envelope glycoprotein of HTLV type 1 induce specific neutralizing antibodies. *AIDS Res. Human Retroviruses*, 2001, 17, 337–348.
- Dube S., Abbott L., Dube D., Dolcini G., Gutierrez S., Ceriani C., Juliarena M., Ferrer J., Perzova R., Poiesz B. The complete genomic sequence of an in vivo low replicating BLV strain. *Virol. J.* 2009, 6, 120.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Po ukończeniu studiów rozpoczęłam pracę w Zakładzie Biochemii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego. Moje zainteresowania naukowe koncentrowały się wokół zastosowania metod biologii molekularnej do diagnostyki i badań nad patogenezą zakażeń retrowirusowych. Moją działalność w tym obszarze można zakwalifikować do siedmiu nurtów badawczych.

5.1 Badania nad diagnostyką i patogenezą zakażeń wirusem niedoboru odporności bydła (BIV) (A.1.1, A.2.1, A.2.2, A.2.10, D.1.1.3, D.1.2.1)

Jedne z moich pierwszych doświadczeń laboratoryjnych dotyczyły metod serologicznych, wirusologicznych i biologii molekularnej w badaniach nad wirusem niedoboru odporności bydła (BIV). Wirus ten należy do rodzaju *Lentivirus*, rodziny *Retroviridae* i obok wirusa enzoptycznej białaczki bydła (BLV) i wirusa syncytialnego bydła (BFV) jest jednym z trzech egzogennych retrowirusów, będących patogenami bydła w warunkach naturalnego zakażenia. W pracach przeglądowych opisałam aktualne dane na temat budowy, zmienności genetycznej, powinowactwa komórkowego a także konsekwencji występowania BIV (D.1.2.1) oraz najnowsze doniesienia dotyczące występowania i diagnostyki zakażeń oraz patogenego potencjału tego wirusa (A.2.1). W pierwszej z prac doświadczalnych razem ze współpracownikami wykazałam, że owce mogą być wartościowym modelem do badań nad BIV, (obecność swoistych przeciwciał oraz provirusowego DNA BIV) (A.1.1). W kolejnej pracy określiłam częstość występowania przeciwciał dla BIV u bydła w Polsce, który wynosił 4,9%, a wartość ta była porównywalna z wynikami otrzymanymi w innych krajach europejskich (A.2.10). Następnie we współpracy z Pracownikami z Zakładu Wirusologii PIWet-PIB – badaliśmy zakażenie wirusem niedoboru odporności bydła w aspekcie współinfekcji wirusami BHV-1, BLV i BVD-MD (A.2.2). Ciekawym elementem prac nad BIV była udana amplifikacja prowirusowego DNA BIV w próbkach przesłanych przed dr O. Limanskaia z Academy of Medical Sciences of Ukraine, co zostało opisane w pracy Limanskaia i wsp.(D.1.1.3).

Głównym owocem tej tematyki badań było uzyskanie przeze mnie stopnia doktora nauk weterynaryjnych w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym w Puławach na podstawie pracy obronionej w listopadzie 2003 roku, której promotorem był prof. dr hab. Jacek Kuźmak.

5.2 Badania nad molekularnymi aspektami diagnostyki i patogenezą enzoptycznej białaczki bydła (A.1.2, A.1.6, A.1.7, A.2.4, A.2.6, A.2.13, A.2.16, A.2.18, D.1.1.1, D.1.2.4)

Najszerzej eksplorowanym przeze mnie tematem podczas mojej pracy zawodowej są zagadnienia związane z zastosowaniem metod biologii molekularnej do badań nad wirusem enzoptycznej białaczki bydła. Na początku mojej pracy powstał artykuł przeglądowy (D1.1.1) pozwalający mi na zapoznanie się z budową genomu BLV i jego funkcjonowaniem ze szczególnym uwzględnieniem latentnego charakteru zakażenia wywoływanego przez ten wirus. Właśnie ze względu na przetrwały charakter zakażenia BLV zajęłam się zastosowaniem testu PCR-ELISA do wykrywania zakażeń BLV. Metoda ta okazała się być bardzo czułą, pozwalająca na wykrycie 10^{-4} ng prowirusowego DNA BLV (A.1.2). W następnej pracy, której celem było wykazanie czy monocytu/makrofagi (M/M) izolowane z krwi naturalnie zakażonych zwierząt mogą być rezerwuarem wirusa białaczki bydła (A.1.7). Obecność zakażenia BLV w M/M potwierdziłam metodą PCR, wykorzystując ponadto produkt PCR w metodzie badania polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA (SSCP), która pozwoliła nam na wykrycie genetycznie różnych form BLV w PBMC i M/M. Technika SSCP była już wcześniej przez nas z powodzeniem wykorzystywana do wykrywania zmienności genetycznej BLV (A.1.6) a ponadto pozwoliła na identyfikację mutantów genetycznych tego wirusa o zmienionej immunogenności, pozyskanych od zwierząt charakteryzujących się brakiem przeciwciał przy jednoczesnym występowaniu DNA-BLV (A.2.4). W oparciu o sekwencje tych mutantów genetycznych zsyntetyzowano peptydy komplementarne do poszczególnych epitopów na białku gp51, odpowiadające zmienionym epitopom oraz trzy peptydy niezmienione opracowane na podstawie sekwencji referencyjnej. Opracowaliśmy testy ELISA w oparciu o peptydy syntetyczne jako antygen diagnostyczny. Zaobserwowaliśmy podwyższoną reaktywność wobec zmutowanego epitopu G kilku surowic dających wynik ujemny w komercyjnych testach ELISA, co sugerowało możliwość występowania zakażenia BLV przez izolat, który wymknął się spod kontroli układu immunologicznego (A.2.6 oraz część składowa kierowanego przeze mnie projektu MNiSW I.1.3). Zmienność genetyczna genu *env* BLV była również badana przez nas metodą RFLP, w oparciu o którą prowadziłam szkolenie dla stażystów z Rosji (III.I.1.4), a wyniki tej pracy zostały opublikowane w manuskrypcie pt. Revisiting the Issue of the Molecular-genetic Structure of the Causative Agent of the Bovine Leukemia Virus in the Russian Federation (D.1.2.4). Zmienności genetycznej genu *env* dotyczyła także praca wykonana w oparciu o próbki pozyskane z Mołdawii. Wykazaliśmy, że izolaty BLV pochodzące z tego kraju reprezentowały genotypy 4 i 7. (A.2.15). Zaawansowaną analizę *in silico* sekwencji nukleotydowej genu *env* i sekwencji aminokwasowej gp51 w oparciu o 256 sekwencji reprezentujących izolaty BLV pochodzące z całego świata przedstawiono w pracy autorstwa Pluta i wsp. (A.2.16). Zbadano w ten sposób globalną zmienność wszystkich determinantów antygenowych w obrębie białka gp51, co pozwoliło określić ich stopień konserwatywności oraz wskazać domeny, które eksponowane na powierzchni białka gp51 mogą mieć wpływ na efektywne indukowanie odpowiedzi immunologicznej. Ostatnio w naszym zespole

badawczym zajęliśmy się zmiennością wirusa białaczki bydła w regionie LTR. Wykazaliśmy, badając izolaty ze wschodniej Europy, że analiza filogenetyczna wykonana w oparciu o region LTR potwierdza podział genetyczny BLV na 10 genotypów. Ponadto zidentyfikowaliśmy istnienie polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP) w miejscu wiązania czynników transkrypcyjnych, co wskazuje na możliwość wpływu tych mutacji na poziom transkrypcji i replikacji BLV (A.2.13., A.2.18.).

Badania nad BLV nadal kontynuuję wykorzystując technikę głębokiego sekwencjonowania (NGS) do dalszego poszerzenia wiedzy na temat zmienności wirusa białaczki bydła analizując aktualnie występowanie zjawiska *quasispecies* i kompartmentalizacji w obrębie tego wirusa (I.1.6, I.1.7).

5.3 Badania nad wykorzystaniem rybozymów do otrzymania zwierząt transgenicznych opornych na zakażenie wirusem białaczki bydła (A.1.5, D.1.1.2)

Białaczka bydła jest również związana z moją kolejną pozycją w działalności naukowej. Prof. dr hab. Jacek Kuźmak zainspirował mnie do zajęcia się zagadnieniem rybozymów w kontekście ich aktywności przeciwwirusowej. Otrzymaliśmy wniosek grantowy pt.: Wykorzystanie przeciwwirusowego działania rybozymów do uzyskania zwierząt transgenicznych opornych na zakażenie wirusem białaczki bydła (BLV)(I.1.1.), który następnie realizowaliśmy razem z zespołem z Instytutu Zootechniki w Balicach k/Krakowa, kierowanym ówczesznie przez prof. dr hab. Z. Smorąga. W wyniku projektu powstały dwie prace – jedna doświadczalna pt: ‘Development of transgenic rabbits with ribozyme directed to bovine leukemia virus rex/tax mRNA’(A.1.5) i druga przeglądowa traktująca o zastosowaniu rybozymów „hammerhead” jako czynników przeciwwirusowych (D.1.1.2).

5.4 Badania nad diagnostyką i patogenezą zakażeń lentiwirusami małych przeżuwaczy (SRLV) u owiec i kóz (A.1.3, A.1.4, A.1.8, A.2.3, D.1.2.2, D.1.2.3, A.2.5, A.2.7, A.2.9, A.2.11)

W trakcie mojej pracy w Zakładzie Biochemii byłam również zaangażowana w prace naszego zespołu dotyczące zakażeń lentiwirusami małych przeżuwaczy. Pierwsze z nich dotyczyły wirusa maedi-visna (MVV), który jest czynnikiem etiologicznym przewlekłej choroby owiec określanej właśnie jako maedi i visna. Początkowe badania dotyczyły oceny swoistości i czułości handlowych testów AGID i ELISA wykorzystywanych w diagnostyce serologicznych zakażeń MVV oraz określenia zasięgu zakażeń tym wirusem w Polsce, który zanotowano średnio na poziomie 49,1% (A.1.3). Następnie ocenialiśmy przydatność techniki semi-nested PCR, które to badania wykonałam, wobec testu ELISA w diagnostyce zakażeń MVV. Zaobserwowaliśmy, nieco niższą czułość testu PCR w porównaniu do testu ELISA, ale przyczyny tego zjawiska upatrywaliśmy

w występowaniu heterogennej pod względem molekularnym populacji wirusa MVV w Polsce (A.1.4). Powyższe badania, jak i następne były przeprowadzone przy współudziale Dr Yahii Chebloune ze Szkoły Weterynaryjnej w Lyonie. Współpraca ta była realizowana w ramach projektów, COCOP INRA/KBN (I.2.1.) oraz POLONIUM (I.2.2), w których uczestniczyłam jako wykonawca. Ponadto w latach 1999-2002 odwiedzałam czterokrotnie laboratorium Dr Yahii Chebloune zapoznając się z techniką izolacji

i hodowli monocytów i makrofagów wywodzących się z komórek jednojądrzastych krwi obwodowej, izolacji wirusa poprzez kokultywację z komórkami błony maziowej torebki stawu kolanowego kozy (GSM - goat synovial membrane) czy techniką pozwalającą na potwierdzanie ekspresji białek wirusowych metodą immunoprecypitacji. Uzyskane przeze mnie doświadczenie zostało zaadaptowane do prac w Zakładzie Biochemii i pozwoliło na przeprowadzenie izolacji i wstępnej charakterystyki dwóch izolatów wirusa *maedi visna* z owiec z Polski (A.2.3).

W pracy dotyczącej zakażenia drugim lentiwirusem małych przeżuwaczy - wirusem zapalenia stawów i mózgu u kóz - CAEV (ang. *caprine arthritis encephalitis virus*) (A.1.8) wykazaliśmy przydatność testu nested PCR, ze zwiększoną czułością poprzez zastosowanie hybrydyzacji z sondą pBSCA CAEV, znakowaną DIG do potwierdzenia obecności prowirusowego DNA CAEV u zwierząt serologicznie ujemnych. Na podobną kwestię zwróciliśmy uwagę w pracy Gil i wsp. (D.1.2.2) gdzie kombinacja dwóch testów serologicznego ELISA i molekularnego PCR dała najlepsze wyniki w diagnostyce zakażeń lentiwirusami małych przeżuwaczy. W tym miejscu warto nadmienić, że właśnie w roku 2006 wykazano, że MVV i CAEV są w stanie pokonać barierę gatunkową wywołując zakażenia międzygatunkowe (*cross-species infections*) i wprowadzono nową klasyfikację tej grupy lentiwirusów jako lentiwirusy małych przeżuwaczy (*small ruminant lentiviruses* – SRLV). Po moim powrocie ze Stanów Zjednoczonych (L.2.), gdzie zapoznałam się z metodami dotyczącymi analizy sekwencji DNA przygotowaliśmy pracę pt.: Molecular characterization of lentiviruses from goats from Poland based on *gag* gene sequence analysis (A.2.5) opisującą właśnie wystąpienie międzygatunkowej infekcji u kozy naturalnie zakażonej izolatem 21PL, wykazującym bliższe pokrewieństwo genetyczne do MVV niż CAEV.

W ramach tego nurtu badań uczestniczyłam również we współpracy z dr hab. J. Kabą, SGGW, Warszawa (Isolation and characterization of caprine arthritis encephalitis virus goats from Poland., A.2.7) oraz z dr hab. inż. Maciejem Murawskim i Prof. dr hab. Edwardem Wierchosiem z Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie (Transplantacja zarodków jako metoda uzyskiwania owiec wolnych od zakażenia wirusem *maedi-visna*, D.1.2.3) wykonując w tych pracach część badań przeprowadzonych metodami biologii molekularnej. Pozostały mi do opisanie dwie ostatnie prace z tego panelu, w których brałam udział. Ciekawe zagadnienie zostało poruszone w pracy Materniak i wsp. (A.2.9) gdzie wykazano obecność zakażenia MVV w komórkach epitelialnych izolowanych z mleka zakażonych owiec wskazując na to, że komórki te są miejscem aktywnej replikacji wirusa. W ostatniej z prac z tego działu

wykorzystano metodę SSCP w celu wykazania heterogenności lentiwirusów małych przeżuwaczy występujących w Polsce (A.2.11).

5.5. Określenie właściwości glikoproteiny gp120 HIV-1 subtypu C oraz charakterystyka kodującego ją genu *env* w aspekcie transmisji wirusa z organizmu matki do dziecka (A.2.8).

Tą tematyką badań zajmowałam się podczas mojego ponad dwuletniego pobytu w Nebraska Center for Virology, University of Nebraska, Lincoln, w Stanach Zjednoczonych w laboratorium kierowanym przez dr C. Wood'a. Współpracuje ono z Uniwersytetem w Zambii, reprezentowanym przez dr C. Kankasa i razem prowadzą szeroko zakrojone badania dotyczące zakażeń wywoływanych przez wirus HIV i KSHV (wirus mięsaka Kaposiego). Uczestniczyłam w projekcie dotyczącym charakterystyki wirusa HIV w aspekcie okołoporodowej transmisji wirusa z matki na dziecko i roli białka Env wirusa w tej transmisji. Opisana w publikacji (A.2.8) część badań przeprowadzona była w oparciu o próbki pochodzące z Zambii a pobrane od sześciu par osób zakażonych tzn. matek i ich dzieci. W pracy analizowano próbki DNA pozyskane z krwi pobranej w momencie narodzin jeśli chodzi o matki i czasu pierwszej pozytywnej reakcji PCR, w przypadku dzieci. Białko Env było charakteryzowane pod względem genetycznym (poznanie sekwencji fragmentu V1-V5 genu *env*, określenie wzoru glikozylacji) oraz biologicznie (synteza białka Env i jego dojrzewanie (*processing*), przyłączanie białek otoczki do formowanej cząsteczki wirionu (*incorporation*), zdolność białka Env do fuzji z komórką, infekcyjność wirusa, poziom replikacji wirusa). Otrzymane wyniki wskazują, że właściwości biologiczne poszczególnych form quasispecies wirusa HIV nie mają raczej znaczenia, a główną rolę w transmisji wirusa ogrywiają indywidualne cechy dawcy i biorcy.

Podczas wyjazdu poszerzyłam, ale i ugruntowałam swój warsztat biologa molekularnego. Uczestniczyłam w otrzymywaniu chimerycznych konstruktów ekspresyjnych białka Env dla każdej z par matka-dziecko wykonując szereg transformacji, izolacji plazmidowego DNA czy analiz restrykcyjnych, zachowując przy tym rygorystyczne wymagania zabezpieczające przed kontaminacją próbek. Wzbogaciłam swoje umiejętności o sekwencjonowanie i obróbkę danych oraz podstawy analizy filogenetycznej. Wykonywałam eksperymenty typu *pulse-chase*. Bardzo wartościowym etapem pracy było dla mnie też poznanie funkcjonowania laboratorium i prowadzenia prac doświadczalnych na trzecim poziomie bezpieczeństwa (BCL-3).

5.6. Wykorzystanie mikromacierzy DNA do badań nad odpornością immunologiczną zwierząt w następstwie zakażeń różnymi patogenami (A.2.12, A.2.17).

W przeciągu ostatnich lat razem z dr Magdaleną Materniak-Kornas zaangażowałyśmy się w aktywność związaną z wykorzystaniem mikromacierzy ekspresyjnych specyficznych dla różnych zwierząt gospodarskich i laboratoryjnych. Dzięki Prof. dr hab. Jackowi Kuźmakowi stworzyłyśmy pracownię mikromacierzową, która wchodzi teraz w skład nowej jednostki badawczej PIWet-PIB -Zakładu Analiz Omicznych.

Jako pierwsza w naszych badaniach pojawiła się tematyka dotycząca zastosowania techniki mikromacierzy DNA do określenia profilu transkrypcyjnego komórek prezentujących antygen (monocyty, makrofagi, komórki dendrytyczne) po zakażeniu BIV lub BFV w warunkach *in vitro* i *in vivo* oraz wykazaniem, które z genów kodujących białka zaangażowane w procesy immunologiczne w APC ulegają nadekspresji lub wyciszeniu jako wynik zakażenia renowirusami. Prace te zostały zapoczątkowane w ramach VI Programu Ramowego UE - EPIZONE. –WP.5.2. Host immune response to infection,(I.B.4.) w którym byłam wykonawcą. W ramach dwóch staży ufundowanych przez EPIZONE zapoznałam się z metodą pozyskiwania monocytów z komórek jednojądrzastych krwi oraz procesu ich hodowli prowadzącej do wyróżnicowania się komórek dendrytycznych (dr L. Dedieu, CIRAD, Montpellier, Francja) a także metodami analiz bioinformatycznych potrzebnych do opracowania wyników mikromacierzowych (dr M.Hulst, Wageningen University and Research Centre, Holandia). Ta tematyka badawcza była kontynuowana w ramach kierowanego przeze mnie projektu badawczego MNiSW - N N308 182438 (I.1.5.). Wyniki badań, które opublikowaliśmy w Archives of Virology (A.2.15), wykazały, że zmiany profilu ekspresji genów makroflagów bydłęcych zakażonych *in vitro* odpowiednio BFV dotyczą genów zaangażowanych w procesy związane z cyklem komórkowym i organizacją przestrzenną komórki, metabolizmem i transportem wewnątrzkomórkowym, a także w procesy odpowiedzialne za odpowiedź na bodźce oraz aktywność układu immunologicznego. Wyszczególniono trzy białka o podwyższonej ekspresji Hsp90b1, HLA-DRb1 oraz Cxorf15 zaangażowane w procesy immunologiczne. W przygotowaniu są kolejne dwie publikacje dotyczące zmian transkryptomu komórek zakażonych wirusem niedoboru odporności bydła.

Celem badań w ostatnio opublikowanej pracy (A.2.17) było przeprowadzenie analizy porównawczej profilu ekspresji różnych grup genów techniką mikromacierzy DNA w grupach świń zakażonych różnymi typami wirusa PRRS i świń niezakażonych. Badania te przeprowadziliśmy we współpracy z dr K. Podgórką (Zakład Chorób Świń, PIWet-PIB) oraz Prof. dr hab. Tomaszem Stadejkiem (SGGW, Warszawa). Wykazaliśmy, że szczepy BOR i ILI (Europa Wschodnia, subtyp 2) w porównaniu do szczepu duńskiego (subtyp 1) charakteryzowały się znacznie silniejszą indukcją genów zaangażowanych w procesy odpowiedzi immunologicznej, w tym elementy odpowiedzi antywirusowej stymulowane przez interferon oraz wskaźniki stanu zapalnego.

5.7. Wirus syncytialny bydła (*Bovine Foamy Virus*) (A.2.14).

W roku 2014 dr Magdalena Materniak –Kornas i Prof. dr hab. Jacek Kuźmak zorganizowali międzynarodową konferencję na temat spumawirusów, w którą zaangażowałam się jako pracownik Zakładu. Niedawną tradycją tych spotkań jest przygotowanie publikacji streszczającej najnowsze osiągnięcia dotyczące *Spumaretrovirinae* prezentowane na danej konferencji na łamach cenionego periodyku wirusologicznego Viruses-Basel. Zostałam zaproszona przez Organizatorów do współdziałania w niniejszym opracowaniu: Tenth International Foamy Virus Conference 2014 – achievements and perspectives (A.2.14).

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

6.1. **Zestawienie dorobku naukowego (na dzień 15.04.2019)**

Liczba publikacji w czasopismach z listy JCR	30
- w tym: opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora	22
- w tym: stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	4
Liczba publikacji w czasopismach spoza listy JCR oraz autorstwa w monografiach	7
Liczba komunikatów konferencyjnych	61
Sumaryczny współczynnik wpływu (Impact Factor, IF)	37,048
- w tym: dla publikacji po uzyskaniu stopnia doktora	33,418
- w tym: dla publikacji stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	10,282
Suma punktów MNiSW	490
- w tym: dla publikacji po uzyskaniu stopnia doktora	425
- w tym: dla publikacji stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	115
Liczba cytowań wg. Web of Science Core Collection	164
- w tym: bez autocytowań	152
Indeks Hirscha wg. Web of Science Core Collection	7

6.2. **Udział w projektach badawczych**

Projekty krajowe:

1. Grant KBN (1998-2001) Nr 5P06K01315 – Wykorzystanie przeciwwirusowego działania rybozymów do uzyskania zwierząt transgenicznych opornych na zakażenie wirusem białaczki bydła (BLV) - **kierownik**
2. Grant KBN (2000-2002) Nr 5P06K02718 – Charakterystyka mutantów genetycznych wirusa enzootycznej białaczki bydła (BLV) izolowanych od bydła w Polsce i ich znaczenie w diagnostyce serologicznej zakażeń tym wirusem - **główny wykonawca**
3. Grant KBN (2003) Nr 5P06K03124 – Opracowanie testu ELISA do diagnostyki zakażeń wirusem niedoboru odporności bydła oraz określenie wpływu tego wirusa na przebieg zakażenia wirusem białaczki bydła - **główny wykonawca**
4. Grant MNiSW (2004-2007) 2 PO4B 009 27 - Opracowanie testów ELISA do wykrywania zakażeń indukowanych wariantami wirusa enzootycznej białaczki bydła (BLV) – **kierownik**
5. Grant MNiSW (2010-2013)- N N308 182438 -Wpływ zakażeń retrowirusami bydła – wirusem niedoboru odporności (BIV) i wirusem syncytialnym bydła (BFV)

na aktywność komórek prezentujących antygen w warunkach zakażenia *in vitro* i *in vivo*- **kierownik**

6. Projekt MNiSW Konsorcjum Naukowe KNOW „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność” – (2015-2018) wiodące laboratorium badawczego KNOW2015/PIWetPIB/LAB1/02/06- „Zastosowanie nowoczesnych technik w badaniach nad patogenezą i zmiennością genetyczną retrowirusów bydła i małych przeżuwaczy” - **kierownik**
7. Projekt badawczy w ramach Funduszu Badań Własnych PIWet-PIB (2019-2020)- Występowanie pseudogatunków (*quasispecies*) i zjawiska kompartmentalizacji wirusa w przebiegu naturalnego zakażenia wirusem enzootycznej białaczki bydła u krów – **kierownik**

Projekty międzynarodowe:

1. Program COCOP INRA/KBN (2001-2002) nr DSUR-NGE-4C1-701 – Molecular characterization of small ruminant lentivirus infection in Poland – **wykonawca**
2. Program POLONIUM (2002-2003) nr KBN-584/E-180/S Występowanie zakażeń wywołanych przez maedi-visna (MVV) u owiec i charakterystyka molekularna wirusa izolowanego w Polsce -**wykonawca**
3. British Council / KBN (2002-2003) nr WAR/341/201 – Improvement of diagnosis of Bovine Immunodeficiency Virus (BIV) infection in cattle from Poland – **wykonawca**
4. VI Program Ramowy UE - EPIZONE. –Work Package 5.2. Host immune response to infection – EPIZONE-Network of excellence for epizootic disease diagnosis and control, 2006-2011 –**wykonawca**
5. British Council/MNiSW, nr WAR/342/124 (2008-2009)- Improvement of diagnosis of infection with bovine retroviruses: bovine leukaemia virus, bovine immunodeficiency virus and bovine foamy virus BLV, BIV and BFV in cattle from Poland, BRITISH-POLISH YOUNG SCIENTISTS PROGRAMME, **kierownik**

6c) Nagrody za działalność naukową

▪ Nagrody na konferencjach:

1. Wyróżnienie dla mgr **M. Roli** za pracę pt.: „Evidences for Bovine Immunodeficiency Virus (BIV) infection in cattle from Poland” zaprezentowaną podczas 6th International Students Scientific Conference, Gdańsk, 1998
2. Dyplom za najlepszą prezentację ustną dla mgr **M.Roli** pt.: „Wykorzystanie przeciwwirusowego działania rybozymów do uzyskania zwierząt transgenicznych opornych na zakażenie wirusem białaczki bydła (BLV)” podczas XI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej w Olsztynie, 18-21 września 2002
3. Wyróżnienie za najlepszą prezentację plakatu pt. Genetic diversity of Bovine Leukemia Virus – evidences for dual infection with two different BLV genotypes. **Rola-Luszczak M.**, Pluta A., Olech M., Kuźmak J., XIII Konferencja Naukowa DIAGMOL, Warszawa, 24.11.2012

- **Nagrody Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych I, II i III stopnia** w kategorii prac oryginalnych (lata 2004, 2008, 2014, 2018)
- **Nagrody I, II i III stopnia przyznawane przez Dyrektora PIWet-PIB** w konkursach na najlepszą publikację pracowników naukowych PIWet-PIB w kategorii prac oryginalnych (2011, 2014, 2015).
- **Nagroda Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi za osiągnięcia w zakresie postępu w rolnictwie, rozwoju wsi, rynkach rolnych i rybołówstwie:**

„Opracowanie i wdrożenie do rutynowej praktyki laboratoryjnej metody real-time PCR do wykrywania prowirusowego DNA wirusa enzootycznej białaczki bydła celem weryfikacji wyników badań serologicznych i potwierdzenia stanu zakażenia” Rola – Łuszczak M., Olech M., Kubiś P., Materniak M, Kozaczyńska B, Krawczak B, Smagacz M., Furtak B., Kuźmak J. – podano do wiadomości 22.11.2012

7. Dorobek dydaktyczno-popularyzatorski

Pięciokrotnie powierzono mi funkcję promotora pomocniczego. Trzy prace doktorskie zostały już obronione (dr Monika Olech, dr Ewelina Iwan, dr Ewa Kwit), dwie są w trakcie realizacji (mgr Aneta Pluta, mgr Paweł Mirosław). Wielokrotnie prowadziłam lub współprowadziłam szkolenia dla pracowników głównie z zagranicznych ośrodków naukowych w ramach działalności Zakładu Biochemii jako Laboratorium Referencyjnego OIE ds. enzootycznej białaczki bydła. Prowadziłam kilkakrotnie wykłady naukowe dla Pracowników PIWet-PIB oraz Doktorantów. Wygłosiłam prelekcję na UMCS Lublin między innymi dla członków Towarzystw Naukowych: PTG, PTM, PTBioch, PTW oraz Studentów. Kilkakrotnie recenzowałam publikacje dla czasopism naukowych (Journal of Virological Methods, Journal of Veterinary Research/ Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy, Veterinarni Medicina, Veterinary Microbiology). Byłam zaangażowana we współtworzenie Zakładu Analiz Omicznych.

dr. Dola-Krawczak

