

Autoreferat

1. **Imię i Nazwisko:** Iwona Bukowska-Ośko

2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:**

- | | |
|-----------|---|
| 2010 | Stopień doktora nauk medycznych uzyskany na I Wydziale Lekarskim Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Zakładzie Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych. Tytuł rozprawy doktorskiej „Identyfikacja oraz analiza molekularna regionu 5'UTR wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) w surowicy krwi i komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) u pacjentów leczonych interferonem i rybawiryną” |
| 2010 | Tytuł diagnosty laboratoryjnego uzyskany w ramach studiów podyplomowych z zakresu Analityka Medyczna, w Centrum Kształcenia Podyplomowego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego |
| 2006 | Tytuł magistra biotechnologii specjalizacja mikrobiologia uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, tytuł pracy: „Analiza funkcjonalna białka OmpR Yersinia enterocolitica – oddziaływanie OmpR z sekwencją promotorową genu inwazyjny”. |
| 2001-2004 | Studia Licencjackie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego na kierunku Biotechnologia specjalizacja Mikrobiologia, tytuł pracy: „Oddziaływania między bakteriami patogennymi a organizmem gospodarza – molekularne podstawy wybranych procesów”. |

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

- | | |
|----------------|---|
| 2010 - obecnie | adiunkt w Zakładzie Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, Warszawski Uniwersytet Medyczny |
| 2010 | asystent w Zakładzie Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, Warszawski Uniwersytet Medyczny |

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

a) Tytuł cyklu tematycznego prac:

„Zastosowanie sekwencjonowania następnej generacji w badaniach nad etiologią i patogenezą zakażeń wirusowych”

Podstawę ubiegania się o tytuł doktora habilitowanego stanowi cykl 5 publikacji powiązanych tematycznie, opublikowanych w latach 2015-2018:

b) Wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego:

1. **Bukowska-Ośko I**, Perlejewski K, Caraballo Cortés K, Pollak A, Berak H, Pawełczyk A, Horban A, Kosińska J, Płoski R, Laskus T, Radkowski M. „Next-generation sequencing analysis of new genotypes appearing during antiviral treatment of chronic hepatitis C reveals that these are selected from pre-existing minor strains”. J Gen Virol. 2018. 99: 1633-1642.

IF=2,514 i MNiSW=30

2. **Bukowska-Ośko I**, Perlejewski K, Pawełczyk A, Rydzanicz M, Pollak A, Popiel M, Cortés KC, Paciorek M, Horban A, Dzieciatkowski T, Radkowski M, Laskus T. „Human Pegivirus in Patients with Encephalitis of Unclear Etiology, Poland”. Emerg Infect Dis. 2018. 24(10):1785-1794.

IF=7,422 i MNiSW=45

3. **Bukowska-Ośko I**, Perlejewski K, Nakamura S, Motooka D, Stokowy T, Kosińska J, Popiel M, Płoski R, Horban A, Lipowski D, Caraballo Cortés K, Pawełczyk A, Demkow U, Stępień A, Radkowski M, Laskus T. „Sensitivity of Next-Generation Sequencing Metagenomic Analysis for Detection of RNA and DNA Viruses in Cerebrospinal Fluid: The Confounding Effect of Background Contamination”. Adv Exp Med Biol. 2017. 944: 53-62

IF=1,937 i MNiSW=25

4. Perlejewski K, **Bukowska-Ośko I**, Nakamura S, Motooka D, Stokowy T, Płoski R, Rydzanicz M, Zakrzewska-Pniewska B, Podlecka-Piętowska A, Nojszewska M, Gogol A, Caraballo Cortés K, Demkow U, Stępień A, Laskus T, Radkowski M. „Metagenomic Analysis of Cerebrospinal Fluid from Patients with Multiple Sclerosis”. Adv Exp Med Biol. 2016. 935:89-98.

IF=1,937 i MNiSW=25

5. Perlejewski K, Popiel M, Laskus T, Nakamura S, Motooka D, Stokowy T, Lipowski D, Pollak A, Lechowicz U, Caraballo Cortés K, Stępień A, Radkowski M, **Bukowska-Ośko I**. „Next-generation sequencing (NGS) in the identification of encephalitis-causing viruses: Unexpected detection of human herpesvirus 1 while searching for RNA pathogens”. J Virol Methods. 2015. 15;226:1-6.

IF=1,508 i MNiSW=20

Łączny współczynnik oddziaływania Impact Factor zgłaszanych prac jako osiągnięcie wynosi 15,316 (pkt. MNiSW = 145)

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

Opracowanie i rozwój technik sekwencjonowania następnej generacji (Next-Generation Sequencing; NGS), stworzyło możliwości przeprowadzania szczegółowej analizy sekwencji kwasów nukleinowych w badanym materiale klinicznym. W zależności od zastosowanego podejścia (analiza genomowa lub metagenomiczna) sekwencjonowanie następnej generacji umożliwia identyfikację i charakterystykę pojedynczych mikroorganizmów lub ich całych populacji. Analiza genomowa wykorzystywana jest m.in. do badania zmienności genetycznej populacji wirusowych, zwłaszcza bardzo zmiennych patogenów takich jak HCV czy HIV, jak również identyfikacji wariantów cechujących się specyficznymi właściwościami czy też unikających odpowiedzi immunologicznej. W mikrobiologii klinicznej natomiast stanowi bardzo dobre narzędzie wykorzystywane do identyfikacji szczepów wielolekoopornych, jak również transmisji i źródeł zakażeń wykorzystując analizę filogenetyczną. Podejście metagenomiczne z zastosowaniem NGS stanowi zupełnie nowy kierunek badań, umożliwiając analizę całych populacji mikroorganizmów występujących w danym środowisku z dużą czułością. Przewagą tego podejścia w odniesieniu do tradycyjnych, rutynowych metod wykorzystywanych w diagnostyce chorób zakaźnych takich jak hodowle mikroorganizmów, metody serologiczne i molekularne, jest brak konieczności posiadania wiedzy na temat patogenów występujących w danym materiale, co ma szczególne znaczenie w kontekście chorób zakaźnych, wywoływanych przez szerokie spektrum czynników etiologicznych. Ponadto umożliwia detekcję mikroorganizmów bez konieczności ich wcześniejszej hodowli oraz identyfikację zakażeń mieszanych wywołanych kilkoma patogenami lub ich wariantami. Z wykorzystaniem analizy metagenomicznej scharakteryzowano cały mikrobiom poszczególnych układów i narządów różnych grup pacjentów, w tym m.in. florę bakteryjną przewodu pokarmowego (Metagenomics of the Human Intestinal Tract). Sekwencjonowanie następnej generacji jest potencjalnie najlepszym narzędziem umożliwiającym detekcję zmiennych mikroorganizmów, diagnostykę zakażeń mieszanych oraz wykrywanie nowych jak również znanych patogenów, ale dotychczas niepowiązanych z danym zaburzeniem.

Przedmiotem prac stanowiących podstawę niniejszego postępowania habilitacyjnego były badania dotyczące możliwości wykorzystania opracowanej metodyki (opartej na sekwencjonowaniu następnej generacji na platformie Illumina) w identyfikacji zakażeń mieszanych oraz zmienności molekularnej wirusów (analiza genomowa), jak również wykrywanie mikroorganizmów w płynie mózgowo-rdzeniowym (analiza metagenomiczna).

Praca nr 1.

Bukowska-Ośko I, Perlejewski K, Caraballo Cortés K, Pollak A, Berak H, Pawełczyk A, Horban A, Kosińska J, Płoski R, Laskus T, Radkowski M. „Next-generation sequencing analysis of new genotypes appearing during antiviral treatment of chronic hepatitis C reveals that these are selected from pre-existing minor strains”. *J Gen Virol.* 2018. 99: 1633-1642.)

W prezentowanej pracy podjęto realizację kilku założeń badawczych dotyczących wykorzystania NGS w kontekście badania zakażeń mieszanych różnymi genotypami wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) w grupie pacjentów z koinfekcją ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV) i HCV podczas leczenia interferonem α i rybawiryną. Wyznaczony kierunek badań dotyczył: a) weryfikacji przydatności NGS w identyfikacji jednoczesnego występowania różnych genotypów HCV w materiale klinicznym; b) identyfikacji różnych genotypów HCV w surowicy krwi oraz komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC); c) określeniu dynamiki zmian w populacji HCV w trakcie leczenia przeciwwirusowego; d) określeniu potencjalnej roli komórek jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC) jako rezerwuaru różnych genotypów wirusa.

Zakażenia mieszane różnymi genotypami wirusa zapalenia wątroby typu C oscylują w granicach 4-17% i mają istotny wpływ na przebieg choroby będąc często odpowiedzialnymi za niepowodzenie terapii antywirusowych. Pojawienie się nowego genotypu w trakcie leczenia może być spowodowane nadkażeniem, jak również ujawnieniem się innego genotypu obecnego już przed leczeniem, który cechuje się słabą replikacją lub większą opornością na leczenie. W związku z dużym potencjałem replikacyjnym HCV, pojawienie się niewielkich różnic w szybkości namnażania się współistniejących wariantów może prowadzić do dominacji w określonej niszy ekologicznej przez jeden z nich. Poprawne określenie genotypu wirusa oraz składu populacji HCV ma istotne znaczenie w diagnostyce zakażeń mieszanych, w kontekście różnicowania nadkażeń oraz koinfekcji. Trudności w określeniu momentu zakażenia oraz precyzyjnego wykrycia współistniejących wariantów warunkują potrzebę poszukiwań lepszych rozwiązań diagnostycznych, gdyż genotypy stanowiące niewielki odsetek populacji są często niewykrywalne przez komercyjne testy laboratoryjne. Rutynowo stosowane metody umożliwiają detekcję określonego genotypu czy wariantu, jeśli stanowi on co najmniej 10-30% populacji wirusa.

W pracy wykorzystano własną procedurę obejmującą amplifikację sekwencji 5'UTR HCV przy użyciu specjalnie zaprojektowanych primerów fuzyjnych. Zastosowane primery oprócz sekwencji specyficznych względem regionu niekodującego HCV (5'UTR) zawierają również sekwencje niezbędne do identyfikacji próbek (kodowanie) oraz przeprowadzenia bezpośredniego sekwencjonowania uzyskanych amplikonów na aparacie MiSeq firmy Illumina.

W prezentowanym badaniu wykazano przydatność NGS w wykrywaniu mieszanek genotypów zwłaszcza w kontekście identyfikacji genotypów niszowych. Wykazano, iż przy zastosowanym podejściu istnieje możliwość detekcji mieszanki genotypów w proporcji 1:10⁴. Analiza zmieszanych ze sobą plazmidów zawierających sekwencje genotypów 1, 3 i 4 w szerokim zakresie proporcji wykazała, iż domieszki plazmidów o najniższym stężeniu 10² kopii na reakcję były zawsze wykrywane, a odsetek wykrywanych sekwencji danego genotypu wynosił 0,01% wszystkich odczytów. Wykluczono wpływ wiremii na wyniki rozkładu genotypów w badanym materiale. Analiza seryjnych rozcieńczeń próbki surowicy krwi (10⁴, 10³, 10² i 10 kopii wirusa na reakcję) o znanym mianie HCV i wcześniej potwierdzoną mieszaniną genotypów 1 i 4 wykazała proporcjonalny względem siebie rozkład genotypów w trzech najwyższych stężeniach, przy których zidentyfikowano sekwencje HCV. Odsetek odczytów genotypu 4 wahał się od 41% do 47%, natomiast genotypu 1 od 53% do 62%.

Wykluczono możliwość nieprawidłowej identyfikacji genotypu spowodowanej brakiem „wierności przepisywania” na poziomie reakcji RT-PCR oraz sekwencjonowania. Oszacowano bowiem, iż prawdopodobieństwo zmiany w segmentach regionu 5'UTR warunkujących genotyp wynosi 1:10⁶ (najmniej liczny genotyp niszowy zidentyfikowany podczas analizy próbek klinicznych stanowił 0,01% względem wszystkich odczytów).

Kolejny etap badań obejmował detekcję mieszanek genotypów w próbkach surowicy krwi i komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) u siedmiu pacjentów z koinfekcją HCV/HIV w celu ustalenia czy przemijająca lub trwała zmiana genotypu podczas leczenia przeciwwirusowego może być wynikiem superinfekcji czy też wynikiem selekcji genotypu niszowego obecnego przed leczeniem. Próbki pochodziły bezpośrednio sprzed rozpoczęcia terapii, z okresu leczenia (2, 4, 6, 8, 12, 20, 24, 36, 44 i 48 tydzień) i 6 miesięcy po zakończeniu leczenia. Mieszaninę dwóch różnych genotypów wykryto w próbkach przed leczeniem u pięciu pacjentów, a odsetek genotypu niszowego oscylował na poziomie od 0,02% do 38%. Przejściową lub trwałą zmianę dominującego genotypu zaobserwowano u sześciu pacjentów. W trzech przypadkach dominujący genotyp 3 został zastąpiony przez genotyp 4, w dwóch przypadkach genotyp 3 został zastąpiony genotypem 1, a u jednego pacjenta genotyp 1 został zastąpiony genotypem 4. Współwystępowanie różnych genotypów HCV jest zatem częste i wydaje się

niedoszacowane w odniesieniu do danych uzyskiwanych z wykorzystaniem rutynowych testów diagnostycznych. Jak wykazano w prezentowanej pracy często drugi genotyp występuje w bardzo niskich stężeniach (od 0,01 – 0,17%). Co ciekawe, w trakcie leczenia dochodziło do zmiany genotypu i dominacji wcześniej mniej licznych genotypów.

Przemijająca obecność lub zmiana dominujących genotypów teoretycznie może być następstwem nadkażenia lub też wynikać z selekcji występującego przed leczeniem mniej licznie reprezentowanego genotypu HCV. W badanej grupie pacjentów wykrycie w pięciu przypadkach obecności dwóch genotypów wirusa przed leczeniem potwierdzałoby drugą możliwość. Natomiast u pozostałych dwóch pacjentów nie można wykluczyć nadkażenia w trakcie leczenia. Przedstawione badanie jest pierwszym, w którym udokumentowano prawdopodobnie większą wrażliwość na leczenie genotypu 3 w porównaniu z genotypami 1 i 4 w warunkach koinfekcji, gdzie konkurencja pomiędzy genotypami jest bezpośrednia.

Analiza wariantów molekularnych genotypów HCV pochodzących z PBMC i surowicy krwi często wykazywała brak zgodności w odniesieniu do proporcji co sugeruje, że PBMC i surowica krwi stanowią dwa oddzielne kompartmenty z własną dynamiką replikacji wirusa.

Praca nr 2.

Bukowska-Ośko I, Perlejewski K, Pawełczyk A, Rydzanicz M, Pollak A, Popiel M, Cortés KC, Paciorek M, Horban A, Dzieciatkowski T, Radkowski M, Laskus T. „Human Pegivirus in Patients with Encephalitis of Unclear Etiology, Poland”. *Emerg Infect Dis.* 2018. 24(10):1785-1794.

Ludzki pegiwirus (HPgV), wcześniej nazywany wirusem zapalenia wątroby typu G lub GBV-C, jest wirusem RNA należącym do rodziny *Flaviviridae* o nieustalonej patologii u człowieka. Sugerowany jest związek pomiędzy zakażeniem HPgV a rozwojem chorób limfoproliferacyjnych: chłoniaka nieziarniczego (non-Hodgkin's lymphoma), ziarnicy złośliwej (Hodgkin's disease) oraz szpiczaka mnogiego (multiple myeloma). Szczególnie interesujący wydaje się wpływ HPgV na przebieg zakażenia HIV u osób z koinfekcją HPgV i HIV. U tych chorych obserwuje się bowiem wolniejszy przebieg zakażenia oraz późniejszy rozwój pełnoobjawowego zespołu nabytego niedoboru odporności (AIDS), jak również dłuższą długość życia w porównaniu do osób niezakażonych HPgV. Częstość zakażenia tym wirusem różni się w poszczególnych regionach geograficznych i oscyluje na poziomie 0,9% do 9%. W Polsce odsetek osób zakażonych wynosi ok. 3,2%. Jego obecność wykazano: w szpiku kostnym, komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) w tym w limfocytach T i B, komórkach NK oraz monocytach, jak również w surowicy krwi, mięśniach, śledzionie, wątrobie i nerkach. Najnowsze badania sugerują możliwość zakażenia przez HPgV ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Obecność wirusa stwierdzono bowiem w mózgu pacjenta z stwardnieniem rozsianym oraz w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) chorego z zapaleniem mózgu (ZM) i koinfekcją HIV. Dotychczas nie wykazano jednoznacznie aktywnej replikacji HPgV w OUN.

W ramach prowadzonych przeze mnie badań obejmujących diagnostykę zapaleń mózgu o nieustalonej etiologii z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji (NGS) przeanalizowano próbki surowicy krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego pochodzące od 96 pacjentów z zapaleniem mózgu w kierunku HPgV oraz dziewięciu najczęściej występujących czynników etiologicznych ZM: wirus opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-1), wirus opryszczki pospolitej typu 2 (HSV-2), wirus ospy wietrznej i półpaśca (VZV), wirus cytomegalii (CMV), ludzki herpeswirus typu 6 (HHV-6), enterowirusy, wirus kleszczowego zapalenia mózgu (TBEV), wirus zachodniego nilu (WNV) oraz ludzkie adenowirusy. Jednocześnie obecność HPgV w surowicy krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym

stwierdzono u 3 pacjentów, przy braku obecności któregośkolwiek z pozostałych poszukiwanych patogenów. U pozostałych pacjentów HSV-1 wykryto w 22 przypadkach, enterowirus w 6, VZV w 5, TBEV w 6 i CMV w 2 przypadkach. Charakterystykę populacji HPgV w poszczególnych kompartmentach: surowicy krwi i PMR przeprowadzono przy wykorzystaniu analizy polimorfizmu konformacji jednoniciowych fragmentów DNA (SSCP) oraz NGS. Weryfikowano zmienność dwóch regionów genomu wirusa: regionu niekodującego 5'UTR oraz regionu kodującego białko E2. Analiza filogenetyczna wykazała obecność kilku wariantów unikalnych dla PMR, u 3 pacjentów w obrębie 5'UTR i dwóch w obrębie regionu kodującego białko E2. Sekwencje unikatowe stanowiły 2,28% - 29,31% wszystkich wariantów dla 5'UTR i 27,28% - 41,78% wszystkich wariantów E2. Zidentyfikowane różnice pomiędzy populacją wirusa w PMR i w surowicy krwi mogą mieć znaczenie biologiczne. Biorąc pod uwagę funkcję regionu 5'UTR można przypuszczać, że przynajmniej niektóre ze zmian nukleotydowych w sekwencji 5'UTR warunkują tropizm komórkowy HPgV. Natomiast na poziomie aminokwasów zaobserwowano dwie unikatowe zmiany w regionie E2 w wariantach zlokalizowanych w PMR w stosunku do wariantów obecnych w surowicy krwi: u jednego pacjenta seryna została zmieniona na fenyloalaninę w pozycji 508, a u drugiego pacjenta, prolina uległa wymianie na leucynę w pozycji 572. Obie zmiany występują w obrębie przewidywanych regionów zawierających epitopy dla komórek B, co sugeruje, iż powstały one w następstwie presji układu immunologicznego. Ponadto druga zidentyfikowana zmiana zlokalizowana jest w regionie E2, zawierającym miejsce antygenowe prawdopodobnie uczestniczące w wiązaniu lub fuzji komórek.

Podsumowując, w pierwszym tego typu badaniu na świecie, wykazano istnienie różnic pomiędzy sekwencjami HPgV pochodzącymi z surowicy krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego, co potwierdza kompartmentalizację wirusa względem ośrodkowego układu nerwowego.

Praca nr 3.

Bukowska-Ośko I, Perlejewski K, Nakamura S, Motooka D, Stokowy T, Kosińska J, Popiel M, Płoski R, Horban A, Lipowski D, Caraballo Cortés K, Pawełczyk A, Demkow U, Stępień A, Radkowski M, Laskus T. „Sensitivity of Next-Generation Sequencing Metagenomic Analysis for Detection of RNA and DNA Viruses in Cerebrospinal Fluid: The Confounding Effect of Background Contamination”. *Adv Exp Med Biol.* 2017. 944:53-62

W prezentowanej pracy oceniona została czułość oraz obserwowane tło (zanieczyszczenia) opracowanej przez nas analizy metagenomicznej, w wykrywaniu wirusów RNA reprezentowanych przez ludzki wirus niedoboru odporności (HIV) i wirusów DNA w oparciu o wirus opryszczki pospolitej (HSV), w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR).

Opracowana procedura obejmuje: izolację materiału genetycznego z PMR, amplifikację RNA z wykorzystaniem izotermicznej amplifikacji RNA (Ribo-SPIA), przygotowanie biblioteki i sekwencjonowanie na platformie Illumina. Jednym z istotniejszych aspektów procesu jest analiza bioinformatyczna stanowiąca ostatni i kluczowy etap badań metagenomicznych. Głównym problemem, z jakim należy się zmierzyć w badaniach opartych na analizie metagenomicznej, jest mała ilość materiału genetycznego potencjalnych czynników zakaźnych w PMR oraz analiza bioinformatyczna uzyskanych danych.

Jednym z kluczowych parametrów wymagających określenia jest optymalna „głębokość” sekwencjonowania niezbędna do identyfikacji patogenu ale także pełnej jego charakterystyki molekularnej.

W prezentowanej pracy głębokość sekwencjonowania została określona na poziomie ok 30 milionów odczytów na próbkę. Uzyskano łącznie 135 838 381 odczytów dla 4 próbek zawierających różne stężenia HSV-1 (10^1 , 10^2 , 10^3 i 10^4 kopii wirusa na reakcję) co stanowi 29,4-37,3 miliona odczytów na próbkę oraz 130 7834 29 dla 4 próbek o analogicznych stężeniach HIV (25,5-38,8 milionów odczytów na próbkę). Sekwencje wirusowe stanowiły 0,001-0,620% wszystkich odczytów w próbkach HIV-dodatnich i 0,040-2,540% wszystkich odczytów w próbkach HSV dodatnich.

Kolejnym istotnym zagadnieniem w przypadku analizy metagenomicznej jest punkt odcięcia, przyjmowany przy ostatecznej interpretacji wyników. Niestety, w przypadku dużej liczby danych, uzyskanych podczas sekwencjonowania następnej generacji, bardzo trudno jednoznacznie określić czy mniej licznie zidentyfikowane sekwencje faktycznie należą do danego patogenu czy też stanowią artefakt reakcji, zanieczyszczenie lub są błędnie przypisanymi odczytami z innej próbki. Istotnym aspektem ułatwiającym interpretację wyników może być odtworzenie genomu mikroorganizmu, a im większy rozkład zidentyfikowanych sekwencji na genomie i procent jego odtworzenia, tym większe prawdopodobieństwo identyfikacji czynnika zakaźnego. Interpretacja wyników na podstawie tego parametru jest ograniczona w przypadku bardzo zmiennym wirusów RNA, próbek o niskim mianie patogenu oraz w przypadku obecności licznych zanieczyszczeń pochodzenia zewnętrznego.

Obecnie nie zostały przyjęte jednoznaczne kryteria warunkujące identyfikację patogenu w badanym materiale. Teoretycznie określenie obecności patogenu może być już możliwe na podstawie jednego lub kilku odczytów przy zastosowaniu kompleksowej analizy bioinformatycznej danych.

W zastosowanym w pracy podejściu udało się wykryć sekwencje HSV i HIV, stanowiące odpowiednio 0,003% i 0,006% wszystkich odczytów. Czułość prezentowanej analizy metagenomicznej oszacowaliśmy na poziomie 10^3 kopii HSV-1 i 10^2 kopii HIV w PMR. Zaobserwowano korelację pomiędzy stężeniem materiału genetycznego analizowanych wirusów a odsetkiem odczytów specyficznych względem HSV i HIV, jak również stopniem odtworzenia badanych patogenów. W przypadku HIV w próbce o stężeniu 10^4 kopii w wirusa aż 96,2% wszystkich odczytów wirusowych wykazywało homologię z genomem HIV (0,6% wszystkich odczytów), odtworzenie genomu HIV uzyskano na poziomie 97,0%. W próbkach zawierających stężenia 10^3 i 10^2 HIV odpowiednio 88,5% i 73,8% spośród sekwencji wirusowych odpowiadało HIV (0,022% i 0,006% wszystkich odczytów). Odtworzenie genomu HIV uzyskano na poziomie odpowiednio 90,2% (10^3 kopii HIV) i 30,0% (10^2 kopii HIV). W przypadku HSV-1 sekwencje specyficzne względem HSV-1 stanowiły odpowiednio 0,13% i 25,90% wszystkich odczytów wirusowych w próbkach o stężeniu 10^3 i 10^4 kopii/reakcję (0,003% i 0,028% wszystkich odczytów). Odtworzenie genomu HSV-1 uzyskano natomiast na poziomie odpowiednio 3,6% i 13,0%.

Drugim zagadnieniem rozpatrywanym w pracy było określenie „tła” ze strony potencjalnych zanieczyszczeń charakterystycznych dla przedstawionej procedury. „Tło” w analizach metagenomicznych stanowią m.in. sekwencje ludzkiego materiału genetycznego, zawarte w odczynnikach (sekwencje bakteryjne) oraz artefakty generowane podczas sekwencjonowania. Potencjalnym rozwiązaniem tego problemu może być stosowanie w każdej analizie kontroli negatywnych, wykonanie analizy w powtórzeniach oraz odpowiednie bioinformatyczne opracowanie danych polegające m.in. na eliminacji najczęściej występujących bakteryjnych zanieczyszczeń lub dokonywanie statystycznej oceny prawdopodobieństwa faktycznej obecności czynnika zakaźnego w próbce.

W prezentowanej pracy uwzględniono wszystkie z powyższych rozwiązań. Jako materiał kontrolny zastosowano dwie próbki wody oraz PMR od pacjenta z chorobą neuronu ruchowego (ang. MND). W próbkach wody dominowały odczyty zakwalifikowane jako „inne” (sekwencje roślinne, wirusy roślinne i konstrukty syntetyczne); (31,4% i 60,3%) jak również sekwencje bakteryjne (5,8% i 21,4%). W PMR

90,8% wszystkich odczytów stanowiły natomiast sekwencje ludzkie, następnie pod względem liczebności dominowały odczyty zakwalifikowane jako „inne” (3,1%) oraz bakteryjne (2,3%). W próbkach PMR zawierających HCV i HIV obserwowaliśmy analogiczny rozkład procentowy odczytów stanowiących tło. Sekwencje ludzkie stanowiły 90% uzyskanych wszystkich odczytów, bakteryjne natomiast oscylowały na poziomie 1%-4,1%.

Podsumowując, prezentowana procedura analizy metagenomicznej uwzględniająca amplifikację RNA Ribo-SPIA, a następnie sekwencjonowanie na platformie Illumina wydaje się być obiecującą metodą umożliwiającą identyfikację patogenów wirusowych. Detekcja zarówno patogenów RNA jak i DNA możliwa jest z czułością na poziomie odpowiednio 10^3 i 10^2 kopii/reakcję. Ze względu na powszechność zanieczyszczeń, uzyskiwane wyniki powinny być potwierdzone innymi niezależnymi metodami, takimi jak RT-PCR i PCR. Jak również zaleca się wykonywanie kontroli negatywnych równoległe z próbkami klinicznymi.

Praca nr 4.

Perlejewski K, **Bukowska-Ośko I**, Nakamura S, Motooka D, Stokowy T, Płoski R, Rydzanicz M, Zakrzewska-Pniewska B, Podlecka-Piętowska A, Nojszewska M, Gogol A, Caraballo Cortés K, Demkow U, Stępień A, Laskus T, Radkowski M. „Metagenomic Analysis of Cerebrospinal Fluid from Patients with Multiple Sclerosis”. *Adv Exp Med Biol.* 2016. 935:89-98.

Podstawowym założeniem pracy było poszukiwanie czynnika zakaźnego w PMR u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym (sclerosis multiplex, SM). W tym celu wykorzystano opracowaną i scharakteryzowaną wcześniej (praca nr 3 w cyklu) analizę metagenomiczną. Badanie to jest jedną z pierwszych tego typu analiz na świecie. Identyfikacja patogenu odpowiedzialnego za SM stanowiłaby przełom, który mógłby doprowadzić do poprawy metod leczenia oraz zmienić podejście do samej choroby.

Stwardnienie rozsiane jest najczęściej występującą chorobą demielinizacyjną ośrodkowego układu nerwowego o nieustalonej etiologii. Istnieją liczne przesłanki o potencjalnie zakaźnej etiologii SM, w tym potwierdzona indukcja procesów demielinizacyjnych przez czynniki zakaźne (np. wirus odry, ospy czy koronawirusy) czy też wysokie stężenie IgG w płynie mózgowo-rdzeniowym obecne także w innych zaburzeń OUN o podłożu zapalnym i mające etiologię zakaźną (np. podostre stwardniające zapalenie mózgu) oraz wczesne zjawiska autoimmunologiczne zachodzące u pacjentów z SM m.in. potencjalnie związane ze śmiercią oligodendrocytów (pierwszy rzut choroby).

Dotychczas nie udało się jednoznacznie określić związku pomiędzy występowaniem danego patogenu a rozwojem SM. Detekcja czynnika zakaźnego u tych pacjentów jest obarczona licznymi trudnościami technicznymi i metodologicznymi co ma związek ze specyfiką przebiegu SM oraz właściwościami samych patogenów. Materiał powinien pochodzić z jak najwcześniejszej fazy choroby, gdyż prawdopodobieństwo występowania patogenu jest wówczas największe. Ponadto niska replikacja wirusa lub jego latentność, minimalizuje skuteczność metod bezpośredniej detekcji patogenu, może on również nie namnażać się w hodowlach komórkowych. Z tego względu analiza metagenomiczna, umożliwiająca charakterystykę całego mikrobiomu, wydaje się optymalnym narzędziem do poszukiwania potencjalnego czynnika zakaźnego.

W badaniu przeanalizowano PMR od 12 pacjentów z idiopatycznymi, demielinizacyjnymi zaburzeniami zapalnymi (IIDD) ośrodkowego układu nerwowego: w tym 10 pacjentów z rozpoznaniem stwardnieniem rozsianym, jednego pacjenta, u którego rozpoznano klinicznie izolowany zespół (CIS) oraz jednego z nawracającym zapaleniem nerwu wzrokowego. Równoległe z próbkami klinicznymi

analizowano, jako kontrolę negatywną materiał pozyskany od pacjenta z zaburzeniami neurologicznymi o niezapalnym charakterze. Łącznie otrzymano 441 608 474 odczytów. We wszystkich próbkach dominowały odczyty zidentyfikowane jako ludzkie (84%-97% wszystkich odczytów w próbkach CSF od pacjentów z IIDD oraz 91% w materiale kontrolnym). Sekwencje wirusowe stanowiły odpowiednio: pacjenci z IIDD 0,00085%-0,97591% wszystkich odczytów, kontrola 0,01338%. We wszystkich próbkach spośród odczytów wirusowych zidentyfikowano te należące do bakteriofagów. Wyłącznie w jednej próbce pochodzącej od pacjenta z CIS znaleziono 11 odczytów odpowiadających sekwencjom wirusa ospy wietrznej i półpaśca. VZV jest patogenem o właściwościach neurotropowych i stanowi czynnik etiologiczny m.in. zapalenia mózgu (ZM). Fakt wykrycia patogenu u pacjenta z CIS również ma istotne znaczenie gdyż jest to okres pojawienia się pierwszych objawów klinicznych aż u 85% chorych z SM czyli z najwcześniejszej fazy choroby.

Podsumowując, identyfikacja sekwencji VZV u pacjenta z rozpoznaniem CIS może stanowić podstawę do prowadzenia dalszych badań.

Praca nr 5.

Perlejewski K, Popiel M, Laskus T, Nakamura S, Motooka D, Stokowy T, Lipowski D, Pollak A, Lechowicz U, Caraballo Cortés K, Stępień A, Radkowski M, **Bukowska-Ośko I.** „Next-generation sequencing (NGS) in the identification of encephalitis-causing viruses: Unexpected detection of human herpesvirus 1 while searching for RNA pathogens”. *J Virol Methods*. 2015. 15;226:1-6.

Wirusowe zapalenie mózgu jest złożonym zaburzeniem neurologicznym, często o ciężkim przebiegu i poważnych powikłaniach neurologicznych. Dotychczas zidentyfikowano ponad 100 wirusów mogących stanowić podłoże zapalenia mózgu, w praktyce czynnik etiologiczny udaje się jednak ustalić wyłącznie w 40 - 70% przypadków. Polskie dane epidemiologiczne wskazują, iż w 2007 roku zarejestrowano 281 przypadków wirusowych zapaleń mózgu, natomiast czynnik etiologiczny ustalono wyłącznie u 26% chorych. Tak niski odsetek zidentyfikowanych zakażeń wynika prawdopodobnie z braku optymalnych testów diagnostycznych.

Głównym wyzwaniem diagnostyki zapaleń mózgu jest duża liczba i różnorodność potencjalnych czynników zakaźnych wywołujących chorobę. Stosowane obecnie, w ramach rutynowej diagnostyki, metody serologiczne oraz molekularne cechują się swoistością względem określonych patogenów, z tego względu panel poszukiwanych patogenów ogranicza się do tych najczęściej wywołujących daną chorobę. Ograniczanie liczby czynników zakaźnych w panelu diagnostycznym niewątpliwie zmniejsza prawdopodobieństwo określenia etiologii obserwowanych zaburzeń. Identyfikacja natomiast rzadko występujących lub nietypowych czynników zakaźnych (tzw. „emerging”) staje się niemożliwa.

Rozwiązaniem trudności diagnostycznych wymienionych zakażeń może być analiza metagenomiczna wykorzystująca sekwencjonowanie następnej generacji. Z tego względu podjęliśmy badania dotyczące identyfikacji patogenów u pacjentów z ZM o nieznannej etiologii z wykorzystaniem opracowanej analizy metagenomicznej. W trakcie prowadzonych badań u jednego z pacjentów stwierdzono obecność sekwencji wirusa opryszczki pospolitej (HSV-1). Przypadek ten został opisany w prezentowanej publikacji. Materiał (PMR) pochodził od 60 letniego pacjenta z objawami ZM, u którego z wykorzystaniem rutynowych metod diagnostycznych nie zidentyfikowano czynnika etiologicznego obserwowanych zaburzeń. Po sekwencjonowaniu uzyskano 1578856 odczytów z czego 2579 wykazywało homologię do genomu HSV-1 (99,8% sekwencji spośród tych zidentyfikowanych jako wirusowe). Jako kontrole negatywne (brak obecności HSV-1), zaprezentowano wyniki uzyskane dla

dwóch innych pacjentów z ZM o nieznannej etiologii oraz pojedynczego pacjenta z SM. We wszystkich przypadkach nie stwierdzono obecności sekwencji HSV-1 wykluczając tym samym możliwość zanieczyszczenia. Wynik analizy metagenomicznej potwierdzono wykorzystując reakcję PCR swoistą dla HSV-1. Odtworzono również genom wirusa poprzez naniesienie uzyskanych odczytów na sekwencję referencyjną HSV-1. Rozkład zidentyfikowanych sekwencji na całej długości genomu HSV-1 jest kolejnym potwierdzeniem wiarygodności uzyskanego wyniku analizy metagenomicznej. Co istotne, przy użyciu RNA jako matrycy został wykryty wirus DNA, co oznacza, że stosowane podejście umożliwia jednoczesną detekcję wirusów RNA i DNA. Może być to spowodowane zarówno wykrywaniem wirusowego mRNA jak również obecnością DNA po ekstrakcji RNA, co umożliwiło wykrycie zarówno sekwencji RNA, jak i DNA. W naszym badaniu znacząca obecność DNA po ekstrakcji RNA została potwierdzona ilościowymi testami molekularnymi z wykorzystaniem plazmidu jako matrycy.

Podsumowanie:

W publikacjach składających się na cykl przedstawiono oryginalne podejście oparte na NGS z analizą genomową i metagenomiczną do badań etiologii i patogenezы zakażeń. Opracowana unikalna w skali świata metodologia może stanowić punkt wyjścia do dalszych badań w zakresie zakażeń wirusowych człowieka.

Za najważniejsze osiągnięcia w przedstawionym cyklu uważam:

- nowatorskość i innowacyjność podejmowanej tematyki, dotyczącej zakażeń OUN zarówno w kontekście identyfikacji znanych jak też nieznanych czynników etiologicznych ZM czy SM;
- możliwość identyfikacji zakażeń mieszanych różnymi genotypami HCV, przede wszystkim w przypadku dużych dysproporcji ilościowych między nimi (detekcja genotypów niszowych);
- wykazanie obecności unikatowych wariantów HPgV w OUN co potwierdza lokalizację wirusa w tym kompartmentcie;
- możliwość identyfikacji czynników etiologicznych u pacjentów z ZM;
- wykrycie VZV jako jednego z potencjalnych czynników zakaźnych związanych ze zjawiskami demielinizacyjnymi u pacjentów z SM.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

5.1. Analiza bibliometryczna dorobku naukowego

Łącznie z przedstawionymi publikacjami wchodzącymi w skład osiągnięcia naukowego jestem autorem lub współautorem 29 pełnotekstowych prac oryginalnych (w tym 23 z IF), 1 opisu przypadku oraz 3 prac poglądowych.

Łączny impact factor: 63,655

Całkowita liczba cytowań (wg ISI Web of Science Core Collection) z dnia 8.01.2019 (bez autocytowań) = 88

Indeks Hirscha = 6

5.2. Pozostałe prace

Oprócz prac prezentowanych w ramach cyklu publikacji jestem współautorem prac badawczych dotyczących zakażeń wirusowych u ludzi z uwzględnieniem przede wszystkim patogenów hepatotropowych i neurotropowych. W większości prac zastosowano nowoczesne metody i podejścia badawcze w tym: metody molekularne (RT-PCR, PCR, nested PCR, qPCR), SSCP, klonowanie, sekwencjonowanie (Sanger, NGS), cytometrię przepływową i barwienia histochemiczne.

Obecnie głównym zakresem moich zainteresowań badawczych jest analiza metagenomiczna.

Dodatkowo planuję również rozszerzyć zakres prowadzonych badań o analizę bakteriologiczną.

Łączny IF pozostałych prac to 48,339.

Tematyka realizowanych prac:

- a) Zmienność wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) w kontekście leczenia interferonem i rybawiryną: poszukiwanie czynników predykcyjnych skutecznej terapii przeciwwirusowej i analiza dynamiki zmian w populacji HCV.

Wybrane publikacje:

1. Caraballo Cortes K, **Bukowska-Ośko I**, Pawełczyk A, Perlejewski K, Płoski R, Lechowicz U. , Stawiński P, Demkow U, Laskus T, Radkowski M. Next-Generation Sequencing of 5' Untranslated Region of Hepatitis C Virus in Search of Minor Viral Variant in a Patient Who Revealed New Genotype While on Antiviral Treatment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016;885:11-23.
2. **Bukowska-Ośko I**, Pawełczyk A, Perlejewski K, Kubisa N, Caraballo-Cortes K, Rosińska M, Płoski R, Fic M, Kaźmierczak J, Popiel M, Ząbek P, Horban A, Radkowski M, Laskus T. Genetic Variability of Hepatitis C Virus (HCV) 5' Untranslated Region in HIV/HCV Coinfected Patients Treated with Pegylated Interferon and Ribavirin. *PLoS One*. 2015;10(5):e0125604
3. **Bukowska-Ośko I**, Caraballo-Cortes K, Pawełczyk A, Płoski R, Fic M, Perlejewski K, Demkow U, Berak H, Horban A, Laskus T, Radkowski M. Analysis of genotype 1b hepatitis C virus IRES in serum and peripheral blood mononuclear cells in patients treated with interferon and ribavirin. *BioMed Research International*. 2014;2014:1-7.
4. **Bukowska-Ośko I**, Radkowski M, Pawełczyk A, Rosinska M, Caraballo-Cortes K, Płoski R, Berak H, Horban A, Stanczak J, Fic M, Laskus T. Hepatitis C virus 5' untranslated region variability correlates with treatment outcome. *Journal of Viral Hepatitis*. 2014;21(8):551-559.
5. Caraballo-Cortes K, Zagordi O, Perlejewski K, Laskus T, Maroszek K, **Bukowska-Ośko I**, Pawełczyk A, Płoski R, Berak H, Horban A, Radkowski M. Deep sequencing of hepatitis C virus hypervariable region 1 reveals no correlation between genetic heterogeneity and antiviral treatment outcome. *BMC Infectious Diseases*. 2014;14:1-9.
6. Caraballo-Cortes K, Zagordi O, Laskus T, Płoski R, **Bukowska-Ośko I**, Pawełczyk A, Berak H, Radkowski M. Ultradeep pyrosequencing of hepatitis C virus hypervariable region 1 in quasispecies analysis. *BioMed Research International*. 2013;2013:1-10.

7. Caraballo-Cortes K, Laskus T, **Bukowska-Ośko I**, Pawełczyk A, Berak H, Horban A, Fic M, Radkowski M. Variability of hepatitis C virus hypervariable region 1 (HVR-1) during the early phase of pegylated interferon and ribavirin therapy. *Advances in Medical Sciences*. 2012;57(2):370-374.
8. Caraballo-Cortes K, **Bukowska-Ośko I**, Pawełczyk A, Berak H, Fic M, Horban A, Radkowski M. Analiza porównawcza regionu 5'UTR oraz HVR1 wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) w surowicy i komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) we wczesnej fazie leczenia interferonem i rybawiryną. *Przegląd Epidemiologiczny*. 2011;65(2):319-324.

W wymienionych pracach analizowano zmienność genetyczną HCV w obrębie regionu niekodującego 5'UTR oraz regionu kodującego białko E2. Zjawisko zmienności analizowano w kontekście leczenia przeciwwirusowego interferonem alfa i rybawiryną. Badano dynamikę zmian HCV w surowicy krwi i PBMC, zjawisko zakażeń mieszanymi genotypami HCV, rolę PBMC w kontekście skuteczności leczenia oraz wpływ HIV na zmienność HCV w trakcie leczenia. Określono również związek pomiędzy zmiennością HCV w obrębie regionu 5'UTR a skutecznością leczenia IFN i rybawiryną wykluczono również wpływ zmienności E2 na przebieg leczenia.

b) Zmienności genetyczna wirusa zapalenia wątroby typu C: analiza epidemiologiczna (ustalenie źródła zakażenia)

1. Caraballo Cortes K, Zagordi O, Jabłońska J, Pawełczyk A, Kubisa N, Perlejewski K, **Bukowska-Ośko I**, Płoski R, Radkowski M, Laskus T. Spouse-to-Spouse Transmission and Evolution of Hypervariable Region 1 and 5' Untranslated Region of Hepatitis C Virus Analyzed by Next-Generation Sequencing. *PLoS One*. 2016;11(2):e0150311.
2. Caraballo Cortes K, Rosińska M, Janiak M, Stępień M, Zagordi O, Perlejewski K, Osuch S, Pawełczyk A, **Bukowska-Ośko I**, Płoski R, Grabarczyk P, Laskus T, Radkowski M. Next-generation sequencing analysis of a cluster of hepatitis C virus infections in a haematology and oncology center. *PLoS One*. 2018;13(3):e0194816.0.1371

W pracach analizowano transmisję zakażenia HCV. Wykazano, iż z metoda pirosekwencjonowania (NGS) w połączeniu z analizą filogenetyczną oraz klasyczną analiza epidemiologiczna może pomóc w śledzeniu epidemii HCV i określaniu źródeł zakażenia. Analiza ogniska zakażenia HCV nabytego w warunkach szpitalnych ujawniła obecność bardzo blisko spokrewnionych wariantów o niskiej różnorodności u wszystkich pacjentów, co sugeruje wczesne zakażenie tym samym szczepem wirusa. W kolejnej pracy udokumentowano transmisję zakażenia HCV drogą płciową.

c) Wirusowe zapalen mózgu: epidemiologia i etiologia

Wybrane publikacje:

1. Lipowski D, Popiel M, Perlejewski K, Nakamura S, **Bukowska-Ośko I**, Rzakiewicz E, Dzieciatkowski T, Milecka A, Wenski W, Cizek M, Dębska-Ślizień A, Ignacak E, Caraballo Cortes K, Pawełczyk A, Horban A, Radkowski M, Laskus T. A Cluster of Fatal Tick-borne Encephalitis

Virus Infection in Organ Transplant Setting. *Journal of Infectious Diseases*. 2017;215(6):896-901.

2. Popiel M, Perlejewski K, Bednarska A, Dzieciatkowski T, Paciorek M, Lipowski D, Jabłonowska M, Czeszko-Paprocka H, **Bukowska-Ośko I**, Caraballo Cortes K, Pawełczyk A, Fic M, Horban A, Radkowski M, Laskus T. Viral etiologies in adult patients with encephalitis in Poland: A prospective single center study. *Plos One*. 2017;12(6):e0178481.
3. Jabłońska J, Popiel M, **Bukowska-Ośko I**, Perlejewski K, Caraballo Cortes K, Horban A, Demkow U, Laskus T, Radkowski M. No evidence of West Nile virus infection among Polish patients with encephalitis. *Central European Journal of Immunology*. 2016;41(4):383-385.

W pracach badano wirusowe czynniki etiologiczne zapaleń mózgu w Polsce z wykorzystaniem rutynowych badań diagnostycznych: molekularne i serologiczne jak również NGS (analiza metagenomiczna). Przyczyniły się one do określenia sytuacji epidemiologicznej zakażeń OUN w Polsce.

Wykazano również możliwość transmisji zakażenia TBEV wraz z przeszczepionymi organami od dawcy z niezdiagnozowanym zapaleniem mózgu.

d) Aspekty aktywacji układu immunologicznego w odpowiedzi na zakażenie HCV

Wybrane publikacje:

1. Jabłońska J, Pawłowski T, Laskus T, Zalewska M, Inglot M, Osowska S, Perlejewski K, **Bukowska-Ośko I**, Caraballo-Cortes K, Pawełczyk A, Ząbek P, Radkowski M. The correlation between pretreatment cytokine expression patterns in peripheral blood mononuclear cells with chronic hepatitis C outcome. *BMC Infectious Diseases*. 2015;15:1-8.
2. Radkowski M, Opoka-Kegler J, Caraballo-Cortes K, **Bukowska-Ośko I**, Perlejewski K, Pawełczyk A, Laskus T. Evidence for immune activation in patients with residual hepatitis C virus RNA long after successful treatment with IFN and ribavirin. *Journal of General Virology*. 2014;95(9):2004-2009.

W przedstawionych badaniach analizowano odpowiedź immunologiczną przed i po leczeniu IFN i rybawiryną pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C potwierdzając istotną rolę układu immunologicznego w eliminacji zakażenia.

e) Pozawątrobowa replikacji HCV i HPgV

Wybrane publikacje:

1. Kisiel E, Radkowski M, Pawełczyk A, Horban A, Stańczak J, **Bukowska-Ośko I**, Caraballo-Cortes K, Kaźmierczak J, Popiel M, Laskus T. Seronegative hepatitis C virus infection in patients with lymphoproliferative disorders. *Journal of Viral Hepatitis*. 2014;21(6):424-429.3
2. Pawełczyk A, Kubisa N, Jabłońska J, **Bukowska-Ośko I**, Caraballo-Cortes K, Fic M, Laskus T, Radkowski M. Detection of hepatitis C virus (HCV) negative strand RNA and NS3 protein in peripheral blood mononuclear cells (PBMC): CD3+, CD14+ and CD19+. *Virology Journal*.

2013;10:1-6.

3. Pawełczyk A, Polańska M, Kisiel E, Chmielewski M, **Bukowska-Ośko I**, Caraballo-Cortes K, Fic M, Warzocha K, Radkowski M. An analysis of HCV nonstructural NS3 protein expression in bone marrow cells of HCV-infected patients with hematological disorders. *Experimental and Clinical Hepatology*. 2009;5(3-4):44-46.
4. Pawełczyk A, Polańska M, Kisiel E, Chmielewski M, **Bukowska I**, Fic M, Radkowski M. Replikacja wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) w szpiku kostnym pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi. *Przegląd Epidemiologiczny*. 2009; 63(1):29-33
5. Pawełczyk A., Polańska M., Chmielewski M., **Bukowska I.**, Radkowski M., Fic H. Replication of frequency of hepatitis C virus (HCV) in long – term culture of macrophages from healthy donors, *Ann.UMCS*. 2008; 2,12:73-78
6. Kisiel E, Pawełczyk A, Chmielewski M, Caraballo-Cortes K, **Bukowska-Ośko I**, Fic M, Centkowski P, Warzocha K, Radkowski M. Replication analysis of hepatitis G virus (HGV)/GBV-C in bone marrow of patients with B-cell lymphoproliferative disorders and Hodgkin' s disease. *Experimental and Clinical Hepatology*. 2009;5(3-4):29-31.

W przedstawionych pracach badano aktywną replikację HCV i HPgV w PBMC oraz w komórkach szpiku kostnego w kontekście zaburzeń hematologicznych. Pozawątrobową replikację HCV badano m.in. przy zastosowaniu własnej metodyki opartej na identyfikacji w kompartmentcie komórkowym białka NS3 wirusa.

5.3. Nagrody i Stypendia

- 2017 Nagroda naukowa III stopnia Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego za współautorstwo pracy pt. „Spouse-to-Spouse transmission and evolution of hypervariable region I and 5' Untranslated Region of Hepatitis C virus analyzed by Next-Generation Sequencing”
- 2016 Nagroda naukowa II stopnia Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego za współautorstwo pracy pt. „Genetic Variability of Hepatitis C Virus (HCV) 5' Untranslated Region in HIV/HCV Coinfected Patients Treated with Pegylated Interferon and Ribavirin”
- 2015 Nagroda naukowa III stopnia Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego za współautorstwo pracy pt. „Evidence for immune activation in patients with residual Hepatitis C virus RNA long after successful treatment with IFN and ribavirin”.
- 2009 Mazowieckie Stypendium Doktoranckie

5.4. Doświadczenie dydaktyczne

- przedmiot „Choroby zakaźne” dla studentów 3, 4 i 5 roku kierunku lekarskiego I i II Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny
- przedmiot „Diagnostyka laboratoryjna” dla studentów 4 roku kierunku lekarskiego I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny
- przedmiot „Immunopatologia” dla studentów 4 roku kierunku Analityka Medyczna, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny
- przedmiot „Infectious diseases” prowadzony w języku angielskim, dla studentów 4 i 5 roku kierunku lekarskiego II Wydział Lekarski z Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Warszawski Uniwersytet Medyczny

- przedmiot „Immunology” prowadzony w języku angielskim, dla studentów 1 roku kierunku lekarskiego II Wydział Lekarski z Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Warszawski Uniwersytet Medyczny

5.5. Promotorstwo prac magisterskich i rozpraw doktorskich

promotor pomocniczy rozprawy doktorskiej

- 2016 mgr Perlejewski Karol: „Zastosowanie sekwencjonowania następnej generacji do identyfikacji czynników zakaźnych u chorych z zapaleniem mózgu o nieznannej etiologii” praca realizowana na I Wydziale Lekarskim WUM
- 2015 mgr Popiel Marta: „Wykrywanie neurotropowych patogenów u pacjentów z podejrzeniem wirusowego zapalenia mózgu” praca realizowana na I Wydziale Lekarskim WUM

promotor prac magisterskich

- 2013 Osińska Agata: „Ocena stanu wiedzy na temat zagrożeń epidemiologicznych w trakcie podróży” praca na kierunku Pielęgniarstwo,

opiekun prac magisterskich

- 2014 Robak Katarzyna: „Wykrywanie zakażeń mieszanych różnymi genotypami wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) z zastosowaniem dwóch metod sekwencjonowania – sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) oraz sekwencjonowanie metodą Sangera” praca na kierunku Analityka Medyczna,

5.6. Realizowane projekty badawcze

Kierownik

- 2016-2018 Projekt finansowany w ramach działalności naukowej WUM pt. „Detekcja oraz charakterystyka wirusa zapalenia wątroby typu G (HGV)/ GB typu C (GBV-C) w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z zapaleniem mózgu o nieznannej etiologii”
- 2015-2017 Projekt finansowany w ramach działalności naukowej WUM pt. „Wykorzystanie sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) do analizy mikrobiomu pacjentów z zaburzeniami odporności”
- 2013-2015 Grant Fundacji Nauki Polskiej w ramach programu POMOST pt. „Identification of an infectious agents in patients with encephalitis of unknown etiology”
- 2014-2015 Projekt finansowany w ramach działalności naukowej WUM pt. „Wpływ koinfekcji HIV na zmienność wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) w surowicy krwi i komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) u pacjentów w trakcie leczenia interferonem α i rybawiryną”
- 2012-2013 Projekt finansowany w ramach działalności naukowej WUM pt. „Określenie czynnika zakaźnego u pacjentów z objawami wirusowego zapalenia mózgu z wykorzystaniem reprezentatywnej analizy różnicowej (RDA)”

Współwykonawca

- 2018-obecnie Grant NCN „Zastosowanie metagenomiki w identyfikacji czynników zakaźnych u chorych z zapaleniem mózgu i zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych”
- 2017-obecnie Projekt finansowany w ramach działalności naukowej WUM pt. „Wykorzystanie sekwencjonowania następnej generacji (NGS) do wykrywania potencjalnych patogenów indukujących stwardnienie rozsiane (SM)”
- 2015-2017 Projekt finansowany w ramach działalności naukowej WUM pt. „Ocena wpływu zmienności genetycznej wirusa zapalenia wątroby typu C na stan czynnościowy komórek T (wskaźniki wyczerpania immunologicznego)”
- 2015-2016 Projekt finansowany w ramach działalności naukowej WUM pt. „Określenie reaktywności komórek układu odpornościowego na antygeny wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) in vitro w oparciu o analizę STAT-3 i NF-κB techniką cytometrii przepływową”
- 2014-2016 Projekt finansowany w ramach działalności naukowej WUM pt. „Analiza polimorfizmu sekwencji kodujących domeny odpowiedzialne za wiązanie przeciwciał neutralizujących oraz receptorów komórkowych wirusa zapalenia wątroby typu C za pomocą głębokiego sekwencjonowania”
- 2014-2016 Projekt finansowany w ramach działalności naukowej WUM pt. „Występowanie białka NS3 jako markera produktywnego zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) w lokalizacjach pozawątrobowych”
- 2013-2014 Projekt finansowany w ramach działalności naukowej WUM pt. „Analiza genetyczna regionu 5'UTR wirusa zapalenia wątroby typu G (HGV)/GBV-C w komórkach krwi obwodowej (PBMC) oraz szpiku kostnym przy użyciu metody SSCP”
- 2012-2013 Projekt finansowany w ramach działalności naukowej WUM pt. „Zmienność nukleotydowa sekwencji HVR1 E2 wirusa zapalenia wątroby typu C w kontekście skuteczności leczenia przeciwwirusowego”
- 2010-2012 Projekt finansowany w ramach działalności naukowej WUM pt. „Dynamika genetyczna regionu zmiennego HVRI (E2) wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) we wczesnym okresie leczenia jako czynnik prognostyczny skuteczności terapii przeciwwirusowej”
- 2009-2010 Projekt finansowany w ramach działalności naukowej WUM pt. „Badanie zaburzeń czynnościowych komórek układu immunologicznego w odpowiedzi na zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) przy użyciu kompleksowej analizy ekspresji genów komórki”

5.7. Konferencje i doniesienia zjazdowe

Prezentacje ustne

2011 Prelegent na XV Konferencja Naukowa Polskiego Towarzystwa Hepatologicznego, Wrocław 16-18 czerwca „Analiza molekularna regionu 5’UTR HCV w surowicy krwi i PBMC u pacjentów leczonych interferonem i rybawiryną”.

Prezentacje posterowe

- 2014 **Bukowska-Ośko I.**, Perlejewski K., Popiel M., Stokowy T., Nakamura S., Motooka D., Lipowski D., Pollak A., Lechowicz U., Caraballo Cortes K., Pawełczyk A., Laskus T., Radkowski M. „Application of next-generation sequencing (NGS) for identification of etiological factors in patients with viral encephalitis”. VIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa NEUROINFЕКCJE
- 2014 Pawełczyk A., Kubisa N., Tarka S., Olczak M., Zimowska M., **Bukowska-Ośko I.**, Radkowski M. „Występowanie niestrukturalnego białka NS3 oraz materiału genetycznego wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) w próbkach wątroby i tarczycy pobranych w trakcie sądowo-lekarskich sekcji zwłok”. XVII Konferencja Polskiego Towarzystwa Hepatologicznego, Mikołajki
- 2013 Pawełczyk A., Kubisa N., Jabłońska J., **Bukowska-Ośko I.**, Caraballo Cortes K., Fic M., Perlejewski K., Kaźmierczak J., Radkowski M. „Występowanie niestrukturalnego białka NS3, jako markera pozawątrobowej replikacji wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV), w populacjach jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC)”. I Zjazd Polskiego Towarzystwa Wirusologicznego. III Lubelskie Dni Wirusologiczne, Lublin
- 2012 Pawełczyk A., Caraballo Cortes K., Kisiel E., Kubisa N., **Bukowska-Ośko I.**, Fic M., Radkowski M. “Analysis of hepatitis G virus (HGV/GBV-C) replication in serum, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and bone marrow of hepatitis C virus (HCV)-infected patients”. XIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Epidemiologów I lekarzy Chorób Zakaźnych, Wrocław
- 2012 Pawełczyk A., Caraballo Cortes K., Kaźmierczak J., **Bukowska-Ośko I.**, Perlejewski K., Fic M., Radkowski M. „Detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in the serum of seronegative patients with non-Hodgkin’s lymphoma (NHL)”. XIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Epidemiologów I lekarzy Chorób Zakaźnych, Wrocław

5.8. Prowadzone kursy i szkolenia

Prezentacje ustne

2018 Wykład w ramach kursu „Diagnostyka Zakażeń” dla diagnostów laboratoryjnych

5.9. Współpraca

2014 – now Department of Infection Metagenomics, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

11.02.2019
Bukowska - Ośko