

Prof. dr hab. Zbigniew Grądzki

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

### Ocena

#### **rozprawy doktorskiej Pani lek. wet. Sylwii Budniak p.t. “Fenotypowa i genotypowa charakterystyka szczepów *Pasteurella multocida* wyizolowanych od królików w Polsce”**

Pastereloza królików stanowi ciągle aktualny problem kliniczny, epidemiologiczny i ekonomiczny, dostrzegany zwłaszcza w dużych fermach hodowlanych. Zakażenie może przybierać różne formy, od lokalnego zapalenia błony śluzowej układu oddechowego po rozsiane zmiany zapalne wielonarządowe i posocznicę z towarzyszącym wysokim współczynnikiem śmiertelności.

Gramujemne pałeczki *Pasteurella multocida*, będące czynnikiem przyczynowym pasterelozy powszechnie uważane są za drobnoustroje warunkowo chorobotwórcze, bytujące u zdrowych królików jako komensale na błonie śluzowej górnych dróg oddechowych. Uaktywnienie zakażenia wiąże się najczęściej z udziałem czynników wywołujących obniżenie odporności zwierząt, takich jak złe warunki zoohigieniczne, w tym wahania parametrów mikroklimatu, duże zagęszczenie zwierząt, wysokie stężenie amoniaku w środowisku, transport, błędy żywieniowe, stres, ciąża, laktacja i inne. Ważnym czynnikiem usposabiającym jest także wiek zwierząt, a najbardziej narażone są oseski i młode króliki w okresie odsadzania. Do transmisji zakażenia u królików dochodzi drogą aerogenną w przypadku kontaktów zwierząt chorych i zdrowych.

Drobnoustroje *P. multocida*, cechują się zmiennością antygenową, zróżnicowaną predylekcją do gatunku docelowego i różną patogenezą infekcji. Zakażenia u królików wywołują najczęściej bakterie z antygenami otoczkowymi A lub D oraz antygenami somatycznymi 3 i 12. Obecność otoczki zawierającej kwas hialuronowy stanowi ważny czynnik wirulencji tych drobnoustrojów, pełniąc funkcję adhezyjną oraz zapobiegając syntezie specyficznych przeciwciał. Podobną funkcję przypisuje się fimbriom, umożliwiającym

bakteriom przyleganie do błony śluzowej. Część szczepów *P. multocida*, zwłaszcza należących do serotypu D, wytwarza termostabilną dermonekrotoksynę. Białko to stanowi ważny czynnik zjadliwości w przypadku zakażeń świń, natomiast ma mniejsze znaczenie w przypadku pasterelozy królików.

Biorąc pod uwagę zróżnicowanie szczepów *P. multocida* pod względem przynależności serotypowej, budowy antygenowej oraz potencjału patogenetycznego podjęcie przez Doktorantkę szeroko zakrojonych badań dotyczących charakterystyki fenotypowej i genotypowej szczepów *P. multocida* izolowanych z krajowej populacji królików uważam za w pełni uzasadnione. Argumentem potwierdzającym zasadność takich badań jest także niewielka liczba oryginalnych publikacji o analogicznej tematyce, w tym zwłaszcza prezentujących wyniki badań krajowych.

Recenzowana rozprawa doktorska posiada rzadziej już dzisiaj spotykaną formę tradycyjnego wydruku komputerowego oraz układ typowy dla prac doktorskich przygotowywanych w formie monografii. Treść rozprawy podzielona została na 10 głównych rozdziałów, w tym wstęp, cel badań, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, bibliografia oraz spis tabel, rycin i fotografii.

Na początku opracowania Autorka zamieściła wymagane literą prawa stosowne oświadczenia promotora rozprawy i autora. Znajduje się tam także wykaz skrótów i oznaczeń użytych w tekście pracy, który ułatwia czytającemu poruszanie się w obrębie poszczególnych rozdziałów, w tym zwłaszcza w części metodycznej. Jednak nie wszystkie użyte w tekście skróty zostały umieszczone w wykazie i rozwinięte.

W rozdziale „Wstęp” podzielonym na 7 podrozdziałów przedstawiono podstawowe informacje dotyczące zakażeń *P. multocida* ze szczególnym uwzględnieniem królików z zachowaniem układu typowego dla podręcznikowego opisu jednostek chorobowych o etiologii zakaźnej. Doktorantka zwraca uwagę, że w aspekcie chorobotwórczości *P. multocida* jest drobnoustrojem pluripotencjalnym, co przejawia się możliwością wywoływania różnych zespołów chorobowych, takich jak zapalenie błony śluzowej nosa, zanikowe zapalenie nosa, enzootyczne zapalenie płuc i posocznica krwotoczna. Syndromem chorobowym spotykanym najczęściej u królików jest zapalenie błony śluzowej nosa wywoływane przez bakterie z grupy otoczkowej A i D i zanikowe zapalenie nosa wywoływane najczęściej przez drobnoustroje z grupy D. W ostatnich latach znaczenia patogenetycznego w odniesieniu do królików nabierają szczepy *P. multocida* należące do grupy otoczkowej F, które występują powszechnie na

fermach tych zwierząt i wywołują zakażenia o ciężkim przebiegu klinicznym, z wysoką śmiertelnością. W tabeli 1 przedstawiającej zespoły chorobowe wywoływane przez *P. multocida* u różnych gatunków zwierząt i ptaków wraz ze wskazaniem grupy otoczkowej bakterii nie uwzględniono jednak tej grupy w odniesieniu do królików jako gatunku wrażliwego. Ten fakt można częściowo wytłumaczyć zacytowaniem w tabeli danych źródłowych z 2012 r., a więc już nie najnowszych, jakkolwiek przypadki zakażeń królików z udziałem wspomnianej serogrupy opisywane były już w roku 2008.

Tytuł pracy doktorskiej jednoznacznie wskazuje, że przedmiotem naukowych dociekań Doktorantki będą szczepy *P. multocida* izolowane od królików w Polsce, które zamierza Ona scharakteryzować przy wykorzystaniu dostępnych metod oceny fenotypowej i genotypowej. Przyjmując takie założenie nie oczekuje się, że w pracy znajdzie się szczegółowy opis pasterelozy królików jako jednostki chorobowej o etiologii zakaźnej, uwzględniający, poza etiologią, jej przebieg kliniczny, symptomatologię, zmiany anatomopatologiczne oraz rekomendowane postępowanie lekarsko-weterynaryjne. W tym kontekście pewien dysonans wprowadza lektura wstępu rozprawy, który w całości został poświęcony właśnie opisowi pasterelozy królików jako choroby. Myślę, że pewną pomocą i pokusą w przyjęciu takiej konwencji było wcześniejsze opublikowanie z udziałem współautorskim Doktorantki artykułu przeglądowego o tej tematyce w krajowym czasopiśmie „Medycyna weterynaryjna” w roku 2012, który w większości wykorzystany został we wstępie rozprawy. Jestem przekonany, że rozdział „Wstęp” można było zmodyfikować tak, aby w sposób klarowny wprowadzał czytającego w zasadniczą problematykę badawczą rozwijaną w kolejnych rozdziałach rozprawy. Warto o tym pamiętać tym bardziej, że prezentowana wersja pracy doktorskiej oczekuje jeszcze na ostateczną edycję w formie opublikowanych prac eksperymentalnych. Zakładam jednocześnie, że Doktorantka nie musi mojej opinii podzielać, chociaż może wziąć ją pod uwagę traktując jako życzliwą radę.

Jako cel badań Doktorantka przyjęła dokonanie klasyfikacji i zbadanie, w warunkach krajowych, pokrewieństwa terenowych izolatów *P. multocida* pochodzących od królików, a także usprawnienie metod identyfikacji izolowanych szczepów. W ramach 6 celów szczegółowych zaprezentowany został panel metod laboratoryjnych służących do określenia właściwości fenotypowych i genotypowych wyizolowanych szczepów *P. multocida*. Obejmują one określenie właściwości biochemicznych przy użyciu prostych testów biochemicznych i komercyjnych testów API oraz przynależności serotypowej w oparciu o oznaczanie antygenów otoczkowych i somatycznych, charakterystykę białek błony zewnętrznej metodą rozdziału

elektroforetycznego SDS-PAGE, analizę chromosomowego DNA bakterii przy użyciu metody elektroforezy w zmiennym pulsowym polu elektrycznym (PFGE), identyfikację *P. multocida* metoda multiplex PCR, opracowanie metody wykrywania genu *toxA* w szczepach *P. multocida* oraz identyfikację *P. multocida* przy użyciu techniki MALDI-TOF MS.

Badania eksperymentalne Doktorantka przeprowadziła na 3 grupach królików, tj. zdrowych klinicznie, chorujących z objawami zapalenia błony śluzowej nosa i padłych. Od poszczególnych grup zwierząt pozyskano odpowiednio 14 izolatów, 73 izolaty i 28 izolatów *P. multocida*. Warto w tym miejscu podkreślić trafność włączenia do badań grupy królików zdrowych klinicznie, co wiąże się z częstym występowaniem bezobjawowego nosicielstwa bakterii u takich zwierząt, których odsetek w warunkach fermowych może sięgać nawet 60%.

W badaniach szczegółowych wykorzystano 115 szczepów terenowych identyfikowanych jako *P. multocida*. W tej grupie 87 izolatów pochodziło z wymazów z jamy nosowej królików z objawami zapalenia błony śluzowej nosa oraz zwierząt będących nosicielami bezobjawowymi. Odpowiednie liczby wyizolowanych szczepów wynosiły 73 i 14 lub 14 i 73. Kolejną grupę stanowiły szczepy wyizolowane od padłych królików – 28 szczepów, w tym 27 pochodziło z narządów wewnętrznych i jeden szczep z ropnia zlokalizowanego w skórze. Konfrontując dane liczbowe zamieszczone na rycinie 1 i w tabeli 3 widoczna jest niekonsekwencja jeżeli chodzi o liczbę szczepów pochodzących od królików klinicznie zdrowych i wykazujących objawy zapalenia błony śluzowej jamy nosowej. Równolegle, jako układ odniesienia, do badań włączono 9 referencyjnych szczepów *P. multocida* i 6 szczepów referencyjnych innych gatunków drobnoustrojów.

Opisy poszczególnych procedur laboratoryjnych, zamieszczone w rozdziale „Materiał i metody” są bardzo szczegółowe. Ponadto, do opisów procedur dołączone zostały tabele z informacją dotyczącą składu podłoży wykorzystywanych do izolacji drobnoustrojów i do testów biochemicznych, składu buforów reakcyjnych reakcji PCR jak również procedur ekstrakcji DNA i parametrów reakcji PCR. Zamieszczono także dane dotyczące sekwencji starterów reakcji PCR i parametry optymalizacji reakcji amplifikacji. Dzięki tak szczegółowym opisom możliwe jest wiarygodne odtworzenie każdego etapu doświadczenia przeprowadzonego w ramach realizacji rozprawy doktorskiej. Ten fakt miałby istotne znaczenie np. w przypadku kontynuowania przez Doktorantkę badań fenotypowych i genotypowych z użyciem innej puli szczepów *P. multocida*.

Analizując wykorzystywaną w badaniach metodykę badawczą warto zwrócić uwagę na różnorodność stosowanych procedur laboratoryjnych, a także na ich trafny wybór i dostosowanie do zamierzonych celów. Należy także podkreślić nowoczesny charakter wykorzystywanych procedur, co widoczne jest zwłaszcza w odniesieniu do metod biologii molekularnej, służących charakterystyce genotypowej krajowych szczepów *P. multocida* izolowanych od królików oraz ich identyfikacji gatunkowej. W tym miejscu nie można jednak pominąć innej jeszcze grupy metod badawczych, wnoszącej cenne dane dotyczące informacji genetycznej, a mianowicie sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Dzięki tej ultranowoczesnej metodzie możliwe jest równoczesne analizowanie sekwencji wielu genów lub nawet całego genomu. Biorąc dodatkowo pod uwagę techniczne możliwości Jednostki, w której realizowana była rozprawa doktorska oraz potencjał ludzki w postaci Zakładu Analiz Omicznych PIWet warto zadać pytanie czy Doktorantka planowała lub planuje w przyszłości podjęcie dodatkowych badań z wykorzystaniem techniki sekwencjonowania NGS w odniesieniu do krajowych izolatów *P. multocida* pochodzących od królików? Można domniemywać, że wyniki tych badań wniosłyby nowe dane nt. charakterystyki genotypowej szczepów *P. multocida* izolowanych od królików.

Wszystkie szczepy bakteryjne wyizolowane od królików, które na podstawie cech morfologicznych kolonii bakteryjnych i barwienia metodą Grama klasyfikowano jako przypuszczalnie należące do gatunku *P. multocida* zostały w oparciu o wyniki testów biochemicznych ostatecznie uznane jako drobnoustroje z gatunku *P. multocida*. Wyniki badań przeprowadzonych przy użyciu komercyjnych zestawów API 20E i ID 32E zostały przedstawione w tabeli 21 i 22. Niestety, zawarte w obu tabelach dane nie uwzględniają podziału na grupy doświadczalne wskazane na rycinie 1 i w tabeli 3. W opinii recenzenta taka formuła prezentacji wyników badań byłaby logiczną konsekwencją wprowadzonego w części metodycznej podziału zwierząt doświadczalnych na 3 grupy. Wspomniany podział na grupy pominięto także w opisie wyników badań biochemicznych. Jest on natomiast widoczny dopiero w tekście na stronie 52 i na rycinie 3 i 4 na stronie 53 i 54, przedstawiających klasyfikację szczepów *P. multocida* wyizolowanych od królików w zależności od źródła izolacji oraz przynależność szczepów *P. multocida* do grup otoczkowych w zależności od źródła pochodzenia. W obydwu przypadkach interpretację wyników badań utrudnia jednak sprzeczna informacja zawarta na wstępie rozdziału „Materiał i metody”, dotycząca liczby izolatów bakterii pochodzących od poszczególnych grup doświadczalnych. Analogiczna uwaga odnosi się do ryciny 7 prezentującej przynależność serotypową szczepów *P. multocida* w zależności

od źródła pochodzenia i ryciny 9, przedstawiającej wzorce białkowe szczepów *P. multocida* w zależności od źródła pochodzenia. Ponadto, z wartości odsetkowych zawartych na rycinie trudno jest wyprowadzić rzeczywistą liczbę szczepów, zważywszy na różne wartości dotyczące wyjściowej liczby szczepów pochodzących od królików klinicznie zdrowych i wykazujących objawy zapalenia nosa. Dane odnośnie liczby izolatów *P. multocida* pochodzących od królików przypisanych do poszczególnych grup doświadczalnych można ostatecznie zweryfikować dopiero w rozdziale 7 „Streszczenie”. Należy zatem przyjąć, że wiarygodne dane dotyczące liczby szczepów zawarte są w rozdziale „Materiał i metody” na rycinie 1, a nie w tabeli 3.

Pomijając wspomniane uwagi dotyczące liczby szczepów, stwierdzam, że dokumentacja pracy w postaci tabel, rycin i fotografii jest bardzo bogata, profesjonalnie opracowana i czytelna. Doktorantka nie zamieściła jednak fotografii prezentującej wyniki określania antygenów somatycznych metodą precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym (AGID) wg. Heddlestone i wsp.

Uzyskiwane wyniki poddawano analizie statystycznej przy użyciu testu niezależności chi-kwadrat i założonym poziomie istotności  $\alpha=0,05$ . W obliczeniach Autorka posługiwała się programem komputerowym Microsoft Excel 2016. Statystyczne opracowanie wyników badań niewątpliwie wpływa na zwiększenie ich wiarygodności. Wyniki analizy statystycznej wskazują na brak zależności pomiędzy klasyfikacją biochemiczną, przynależnością serotypową szczepów oraz źródłem ich pochodzenia. Analogicznie, w analizie statystycznej wykazano niezależność pomiędzy wzorcami białkowymi szczepów, klasyfikacją biochemiczną, przynależnością serotypową i źródłem pochodzenia izolatów.

Interesujące wyniki uzyskano w porównawczej analizie liczby wyników dodatnich odnośnie wykrywania genu *toxA* przy wykorzystaniu trzech testowanych metod badawczych, tj. testu ELISA, klasycznej metody PCR i real-time PCR. Okazało się, że wyniki obydwu wariantów metody PCR są w pełni zgodne, natomiast przy użyciu komercyjnego testu ELISA uzyskano dwa razy więcej wyników dodatnich w porównaniu do PCR. Doktorantka stawia słuszne przypuszczenie, że zaistniałe rozbieżności można najprawdopodobniej wytłumaczyć dużą liczbą wyników fałszywie dodatnich stwierdzanych w teście ELISA. Warto zaznaczyć, że szczepy toksynotwórcze *P. multocida* pochodziły jedynie od padłych królików.

Analiza rozdziału „Dyskusja” skłania do wyeksponowania kilku krytycznych uwag, które mam nadzieję będą pomocne w opracowywaniu ostatecznej wersji tekstu z przeznaczeniem do opublikowania uzyskanych wyników badań. Nie trudno dostrzec, że w

rozdziale „Dyskusja” Doktorantka ograniczyła się do skrótowego przypomnienia wyników badań własnych oraz przedstawienia komplementarnych wyników badań innych autorów. Taka formuła niestety często dominuje w tego typu rozdziałach, ale z reguły nie wnosi do tekstu pracy istotnych wartości w postaci twórczych hipotez, które powinno się wykorzystać w interpretacji wyników badań. Wyjaśnienie dlaczego uzyskano taki lub inny wynik oraz jakie mogą być tego konsekwencje powinno zdaniem recenzenta stanowić istotę dyskusji w pracach eksperymentalnych.

Ponadto, w przypadku niektórych metod badawczych wykorzystywanych w pracy, jak np. analiza wzorców białkowych białek błony zewnętrznej metodą SDS-PAGE powtórzenie wyników badań własnych przybiera formę zbyt obszerną i nieco razi w rozdziale „Dyskusja”, który z założenia nie powinien zawierać powtórzeń informacji zamieszczonych już wcześniej, natomiast powinien się koncentrować na krytycznej analizie i interpretacji wyników oraz wyjaśnieniach mechanizmów leżących u podstaw uzyskania określonych wyników opisanych w rozdziale „Wyniki badań”.

Niektóre fragmenty rozdziału „Dyskusja” poświęcone opisowi metod badawczych wykorzystanych w rozprawie doktorskiej jak np. opis techniki elektroforezy w zmiennym pulsowym polu elektrycznym bardziej nadają się do zamieszczenia we wstępie rozprawy, zastępując w ten sposób zbędny w tym rozdziale opis pasterelozy jako choroby zakaźnej królików.

Fragmenty rozdziału „Dyskusja” na stronie 87 podsumowujące znaczenie metod fenotypowych oraz ich ograniczenia (pierwszy akapit) oraz przejście do metod genotypowych (drugi akapit) proponuję przenieść wcześniej, tj. w miejsce w którym zaczyna się opis techniki PFGE jako metody genotypowej.

Zamieszczony na stronie 89 opis przebiegu klinicznego zanikowego nieżyty nosa u królików oraz innych zaburzeń wywoływanych przez toksynotwórcze szczepy *P. multocida* można usunąć z tekstu bez uszczerbku dla spójności rozdziału. Także niektóre inne fragmenty dyskusji można pominąć, jak np. opis dotyczący wykorzystywania testu ELISA do wykrywania toksynotwórczych izolatów *P. multocida* wywołujących zakaźne zanikowe zapalenie nosa (ZZZN) u świń.

W całym rozdziale „Dyskusja” widoczne jest wyraźne przesterowanie w kierunku opisów badań różnych autorów, często nie dotyczących szczepów *P. multocida* izolowanych od królików. Taki zbędny balast pozostaje przeważnie w dysproporcji z opisem i interpretacją

wyników badań własnych, przez co dyskusja przypomina bardziej tradycyjny artykuł przeglądowy.

Fragment dyskusji na stronie 96 jest powtórzeniem identycznego fragmentu zamieszczonego w rozdziale „Wstęp” na stronie 23.

Ostatnie fragmenty dyskusji, dotyczące produkcji mięsa króliczego i struktury jego spożycia oraz walorów prozdrowotnych są zbędne i nie mają związku z tematyką pracy doktorskiej.

Z przeprowadzonych badań Doktorantka wyciągnęła 6 wniosków. Na ogół są one prawidłowo sformułowane i mają związek z uzyskanymi wynikami badań. Wniosek 5 można zmodyfikować nie dyskredytując totalnie skuteczności metod serologicznych w odniesieniu do wykrywania dermonekrotoksyny, natomiast wskazując na niższą czułość i specyficzność testu ELISA w porównaniu do metod genetycznych, takich jak PRC i real-time PCR.

Pozostałe uwagi redakcyjne

Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na kilka drobnych uchybień natury redakcyjnej i stylistycznej, które warto skorygować przed przygotowaniem poszczególnych fragmentów rozprawy do druku.

Wielokrotnie w tekście, zwłaszcza we wstępie pracy Autorka używa terminu „błona śluzowa” w liczbie mnogiej, tj. „błony śluzowe”. Traktuję takie zjawisko jako niezręczność stylistyczną, bo anatomicznie błona śluzowa jest jedna, tylko może mieć różną lokalizację. Zatem zręczniejsz byłoby używać w tekście terminów, np. na str. 15 „U zdrowych królików może występować jako komensal na błonie śluzowej jamy nosowej, gardła i tchawicy ... itd.”, lub „... Powodują osuszenie błony śluzowej i porażenie czynności rzęsek ...”. Tym bardziej razi w tym kontekście użyte na str. 21 określenie „błony śluzowe jamy nosowej”.

Także, użyte na str. 16 określenie, cyt. „... ciężkiego, piorunującego włóknikowo-ropnego zapalenia płuc” zawiera niepotrzebny ozdobnik językowy.

W większości rozdziałów pracy przyjęto nazwy łacińskie pisać kursywą, jak np. w przypadku bardzo często używanej nazwy gatunkowej *P. multocida*. Proponuję zatem tę samą konwencję zachować dla innych określeń łacińskich, jak np. *in vitro* na str. 20.



Str. 21. Cyt. „szczepionki są skuteczne w zapobieganiu klinicznej chorobie”. Takie określenie jest skrótem myślowym, ponieważ zapewne chodzi o kliniczną formę choroby, np. w odniesieniu do formy subklinicznej lub poronnej.

Str. 21. Cyt. „procesy odporności na bakteriobójcze działanie surowicy i odporności na fagocytozę”. W tym przypadku lepiej wykorzystać określenie „oporność” (ang. *resistance*, łac. *resistentio*) zamiast „odporność” (ang. *immunity*, łac. *immunitas*).

Str. 21. Wyrażenie „ponowny nawrót choroby” warto skorygować ponieważ delikatnie ociera się ono o pleonazm. W zupełności wystarczy pozostawienie jedynie formy „nawrót choroby”. Alternatywnie, jeśli takich nawrotów jest kilka w przebiegu choroby można ten fakt zaznaczyć poprzez formę „kolejny nawrót choroby”.

Fragment zdania na stronie 72, cyt. „.... Optymalne stężenie koncentracji primerów wynosi ....” wymaga skorygowania.

Niektóre określenia użyte w rozdziale „Materiał i metody” należałoby doprecyzować. Przykładowo, tytuł podrozdziału 3.2.4.2 brzmi „Określenie ilości uzyskanych OPMs”. *De facto*, Autorka oceniała w tym przypadku stężenie białka przy użyciu komercyjnego zestawu Protein Assay Kit. Stąd, dla przejrzystości sformułowania w opisie tego podrozdziału lepiej byłoby użyć określenia „stężenie białka” zamiast „ilość białka”.

#### Podsumowanie

Podsumowując, uważam że recenzowana rozprawa doktorska stanowi opracowanie oryginalne i wnoszące nowe dane do obszaru wiedzy w dziedzinie medycyny weterynaryjnej. W świetle zapisów stosownej ustawy praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Przedłożone do recenzji opracowanie należy uznać za oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Zawiera ono precyzyjnie określone cele badawcze, realizowane konsekwentnie poprzez wykonanie serii pracochłonnych eksperymentów angażujących nowoczesny warsztat metodyczny w postaci metod oceny fenotypowej i genotypowej drobnoustrojów. Oryginalnym osiągnięciem Doktorantki jest dokonanie kompleksowej charakterystyki drobnoustrojów z gatunku *P. multocida* izolowanych od królików. Badania te mają charakter pionierski w warunkach krajowych.

## Wniosek końcowy

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani lek. wet. Sylwii Budniak p.t. "Fenotypowa i genotypowa charakterystyka szczepów *Pasteurella multocida* wyizolowanych od królików w Polsce" odpowiada warunkom określonym w artykule 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce i przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie Pani lek. wet. Sylwii Budniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 27 lutego 2024 r.

  
Prof. dr hab. Zbigniew Grądzki