

18-05-2022

l. dz.....zał.....  
znak sprawy: .....

Olsztyn, 16.05.2022 r.

Prof. dr hab. Andrzej Koncicki  
Katedra Chorób Ptaków  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

## O C E N A

rozprawy doktorskiej **lek. wet. Agaty Mikołajczyk-Martinez** pt. **”Rola fimbrii typu 1 w adhezji i inwazji oraz przeżywalności i cytotoksyczności pałeczek *Salmonella Gallinarum* i *Salmonella Enteritidis* wobec kurzych linii komórkowych”** wykonanej w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod kierunkiem prof. dr hab. Macieja Ugorskiego

Podstawę formalną do wykonania recenzji pracy doktorskiej lek. wet. Agaty Mikołajczyk-Martinez stanowi pismo przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynaria, prof. dr hab. Wojciecha Niżańskiego (MDDD000.4101.18.2018) z dnia 22 marca 2022 r., zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Zakażenia *Salmonella* spp. są ciągle przyczyną znacznych strat ekonomicznych w produkcji drobiarskiej. Straty te wynikają nie tylko z powodu zachorowań i padnięć ptaków, ale także z konieczności wdrażania postępowania administracyjnego przez Inspekcję Weterynaryjną celem wyeliminowania z handlu zanieczyszczonych tymi zarazkami produktów drobiarskich w odniesieniu do niektórych serowarów i/lub uruchamianiem odpowiednich procesów technologicznych (obróbka cieplna). Zakażeniu ulegają i chorują ptaki w każdym wieku, liczne gatunki drobiu, ale z punktu widzenia zagrożeń dla konsumenta, biorąc pod uwagę skalę produkcji, problem głównie dotyczy kur i indyków. Najbardziej groźne są bezobjawowe zakażenia serowarami niespecyficznymi (nieswoistymi) dla drobiu, ponieważ pociąga to konsekwencje epidemiologiczne w postaci toksykoinfekcji pokarmowych u ludzi i niekiedy długotrwałe nosicielstwo. Salmonellozy stanowią dzisiaj duży problem epidemiologiczny zarówno w krajach rozwiniętych gospodarczo i o wysokich standardach higieny, jak i w krajach biednych, o niedostatecznej higienie. Wynika to z trudności w zwalczaniu zakażeń tymi bakteriami, na co składają się między innymi nie do końca poznane mechanizmy patogenezы, jak i bardzo liczne źródła zakażenia (ptaki chore i zakażone

bezobjawowo, gryzonie, ptaki wolno żyjące, inne gatunki zwierząt, pasza i woda, środki transportu, zakłady wylęgowe oraz w ogóle środowisko chowu drobiu) oraz szerzenie zakażeń drogą transowarialną. Sprawia to, że na świecie obserwuje się gwałtowny wzrost liczby intoksykacji pokarmowych u ludzi wywołanych przede wszystkim pałeczkami *Salmonella* (*S.*) Enteritidis, których źródłem na ogół jest żywność zwierzęcego pochodzenia, zwłaszcza drób i jaja. Innym serowarem *Salmonella*, występującym powszechnie u drobiu w krajach rozwijających się, ale także w np. w Chinach, czy Korei Południowej, jest *S. Gallinarum*. Zarazek ten nie stanowi zagrożenia epidemiologicznego dla ludzi, gdyż jest typowo swoisty dla ptaków grzebiących, u których najczęściej wywołuje zakażenia uogólnione, przebiegające z objawami klinicznymi i wysoką śmiertelnością.

Z powyższego wynika, że obraz kliniczny zakażeń drobiu serowarami *Salmonella* niespecyficznymi gatunkowo (*S. Enteritidis*) i specyficznymi (*S. Gallinarum*) na ogół jest różny, przy jak się wydaje podobnej patogenezie zakażeń. Stąd nasuwa się pytanie - jakie czynniki mogą przyczyniać się do tak odmiennego przebiegu tych zakażeń? Na to pytanie stara się udzielić odpowiedzi Autorka ocenianej dysertacji. W tym miejscu chciałbym podkreślić, że Zespół, którym kieruje prof. dr hab. Maciej Ugorski, od wielu lat prowadzi szczegółowe, bardzo zaawansowane metodycznie, w oparciu o nowoczesną aparaturę naukową badania nad patogenezą zakażeń wymienionymi wyżej serowarami tych bakterii. Publikowanie uzyskanych wyników badań w renomowanych, o zasięgu międzynarodowym czasopismach naukowych, świadczy o wysokim ich poziomie merytorycznym. Również przedłożona do recenzji dysertacja doktorska stanowi ważny i bardzo interesujący przyczynek do poznania tych niezwykle złożonych mechanizmów patogenezы zakażeń drobiu pałeczkami *S. Enteritidis* i *S. Gallinarum*.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska jest przedstawiona na 114 stronach manuskryptu i posiada układ typowy dla tego typu opracowań na stopień naukowy. Jest podzielona na dziesięć rozdziałów poprzedzonych stroną tytułową i spisem treści w kolejności:

- wykaz używanych skrótów (2 strony),
- streszczeniami w językach polskim i angielskim (po 3 strony),
- wstęp (21 stron),
- cel pracy (2 strony),
- materiały i metody (21 stron),
- wyniki (21 stron),
- dyskusja (12 stron),
- wnioski (w liczbie 7),



- spis literatury (247 pozycji),
- materiały uzupełniające (5 stron).

Dokumentacja pracy przedstawiona jest na 15 rycinach i w 4 tabelach zamieszczonych w tekście manuskryptu. Zostały one opracowane bardzo starannie graficznie, przez co są czytelne. Przegląd piśmiennictwa oparty jest na 247 starannie dobranych pozycjach, co świadczy o dojrzałości naukowej Autorki dysertacji oraz o aktualności podjętych badań. Przedstawiona do oceny dysertacja napisana jest poprawnym językiem, z prawidłowym użyciem nazewnictwa fachowego.

W obszernym **wstępie**, po krótkim wprowadzeniu w problematykę zakażeń drobiu grzebiącego serowarami *S. Enteritidis* i *S. Gallinarum*, Doktorantka bardzo szczegółowo omawia czynniki wirulencji pałeczek *Salmonella*, w tym cztery systemy sekrecyjne (SS) leżące na wyspach patogenności tych pałeczek (SPI), będące białkowymi kompleksami, które odgrywają istotną rolę w jelitowej fazie zakażenia oraz geny leżące na SPI3 - *mgtCB* (biorą udział w przeżywalności bakterii w makrofagach) i *misL* (koduje adhezynę niefimbrialną MisL, odgrywającą rolę w kolonizacji jelit i występowaniu długotrwałych (często bezobjawowych) zakażeń jelitowych). W dalszej części tego rozdziału Doktorantka omawia występujące u wielu serowarów *Salmonella* plazmidy wirulencji, w tym konserwatywny region zorganizowany w postaci operonu *spvABCD* (ekspresja białek kodowanych przez ten operon jest niezbędna do namnażania bakterii w układzie siateczkowo-śródbłonkowym oraz odpowiada za cytotoksyczność wobec makrofagów i indukcję stanu zapalnego), fimbrie - odgrywające ważną rolę w tworzeniu biofilmu, agregacji bakterii i kolonizacji jelit w początkowej fazie zakażenia, rzęski – zapewniające bakteriom możliwość aktywnego przemieszczania się i kolonizację jelit oraz pyroptozę, czyli prozapalną śmierć komórek poprzez aktywację receptorów NLR w cytoplazmie komórek gospodarza. Ponadto Doktorantka omówiła rolę egzotoksyn wykazujących działanie cytotoksyczne wobec komórek gospodarza i ednotoksyn, w tym lipopolisacharydu -LPS, który poprzez pobudzenie receptora TLR-4 odgrywa istotną rolę w rozwoju szoku septycznego oraz przeżywaniu pałeczek *Salmonella* w przewodzie pokarmowym. Następnie Doktorantka bardzo szczegółowo omawia, uwzględniając w tym rolę przedstawionych wcześniej czynników wirulencji, poszczególne etapy patogenezы zakażeń pałeczkami *Salmonella* drogą alimentarną, które mogą ograniczać się do przewodu pokarmowego lub prowadzić do uogólnienia procesu. W dwóch końcowych częściach wstępu Doktorantka omówiła cytotoksyczność pałeczek *Salmonella* względem komórek gospodarza, w tym apoptozę jako niezapalną formę programowanej śmierci komórkowej, w której uczestniczy szereg kaspaz inicjatorowych i wykonawczych oraz pyroptozę jako programowaną

śmierć komórki, do której dochodzi w wyniku zakażenia komórek patogennymi bakteriami. Jak podkreśla Doktorantka, w trakcie jej przebiegu, kaspaza-1 rozszczepia nieaktywne prekursorzy IL-1b i IL-18 w dojrzałe formy cytokin prozapalnych, czego konsekwencją jest dezintegracja błony komórkowej i degradacja jądra komórkowego. Omówiła także budowę fimbrii typu 1 (T1F) i ich rolę w patogenezie zakażeń pałeczkami *Salmonella* z uwzględnieniem apoptozy i inwazji komórek gospodarza, zwłaszcza pochodzenia nabłonkowego.

Wstęp, który z wielką przyjemnością dokładnie przeanalizowałem, dowodzi bardzo dobrej znajomości przez Doktorantkę problematyki oraz piśmiennictwa (w tym rozdziale zacytowano 197 pozycji, co stanowi 80% ogólnej ich liczby) z zakresu patogenezы zakażeń pałeczkami *Salmonella*. Analiza tego rozdziału wprowadza stopniowo, ale szczegółowo w zagadnienia, których dotyczy dysertacja. Z analizy cytowanego w tym rozdziale piśmiennictwa przekonywująco wynika również cel pracy.

Głównym **celem** badań było udzielenie odpowiedzi na pytanie jakie czynniki i/lub mechanizmy leżą u podstaw różnic, mimo wielu podobieństw, w patogenezы zakażeń serowarami *S. Enteritidis* i *S. Gallinarum* i decydują o odmiennym przebiegu klinicznym tych infekcji? Dla udzielenia odpowiedzi na to pytanie Doktorantka postanowiła określić rolę mannozozależnych fimbrii typu 1 (MST1F) i mannozoniezależnych fimbrii typu 1 (MRT1F), występujących na powierzchni odpowiednio *S. Enteritidis* i *S. Gallinarum*, w przeżywalności i cytotoksyczności kurzych komórek nabłonkowych i kurzych makrofagach. Cele te były realizowane w oparciu o cztery następujące zadania szczegółowe:

1. Otrzymanie mutantów pałeczek *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* pozbawionych zdolności do produkcji T1F (fimbrii typu pierwszego) poprzez nokaut genu *fimH*;

2. Analiza dzikich szczepów *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* oraz ich mutantów delecyjnych niezdolnych do wytwarzania T1F pod kątem ich właściwości adhezyjnych, inwazyjnych i przeżywalności w kurzych komórkach CHICK-8E11 nabłonka jelit oraz kurzych monocytarno-makrofagowych komórkach HD11;

3. Analiza dzikich szczepów *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* oraz ich mutantów delecyjnych niezdolnych do wytwarzania T1F pod kątem ich cytotoksyczności wobec komórek CHICK-8E11 i HD11;

4. Określenie typu śmierci wywołanej zakażeniem *S. Enteritidis* w komórkach HD11.

Kolejny rozdział to „**Materiały i metody**”, w którym Doktorantka w formie tabelarycznej zestawiała wykorzystane w badaniach odczynniki chemiczne, bufony, podłoża mikrobiologiczne, pożywki hodowlane i roztwory stosowane w pracy z komórkami eukariotycznymi, enzymy, gotowe zestawy odczynników wykorzystywanych w pracy z DNA,



standard DNA, oligonukleotydy wykorzystywane w reakcji PCR, szczepy bakteryjne *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* Enteritidis i *Salmonella enterica* Gallinarum, wektory plazmidowe i linie komórkowe (HD-11 – kurza linia monocytarno-makrofagowa i CHIC-8E11 - linia komórkowa wyprowadzona z nabłonka jelit kury) oraz przeciwciała poliklonalne, a także programy komputerowe i aparaturę, które znalazły zastosowanie w realizowanych badaniach.

Następnie w podrozdziale „**Metody**” zamieszczono zwięzły opis badań laboratoryjnych (izolacja plazmidowego DNA na małą skalę, izolacja genomowego DNA, oznaczanie stężenia DNA, reakcja PCR, reakcja PCR dla pojedynczej kolonii bakterii, elektroforeza DNA w żelu agarozowym, oczyszczanie DNA po reakcji PCR, oznaczanie bakterii metodą turbidymetryczną, przygotowanie elektrokompetentnych bakterii i ich elektroporacja, sekwencjonowanie DNA, mikroskopia fluorescencyjna, cytometria przepływowa, krzywe wzrostu pałeczek *Salmonella*, warunki hodowli komórek eukariotycznych, ocena żywotności komórek za pomocą błękitu trypanu, testy adhezyjne i inwazyjne, testy na przeżywalność bakterii po ich wniknięciu do komórek eukariotycznych i uwalniania dehydrogenazy mleczanowej oraz testy apoptotyczne z użyciem zestawów „FLICA 669 caspase-1 assay” oraz „FLICA 660 caspase-3/7 assay”). Wymienione metody świadczą o bardzo dużym zakresie, skrupulatnie przeprowadzonych badań, wykonanych z zastosowaniem nowoczesnych technik, które wymagały od Doktorantki opanowania szerokiej gamy metod badawczych z zastosowaniem technik biologii molekularnej. Zakres wykonanych badań świadczy o bardzo dobrym opanowaniu przez Doktorantkę warsztatu badawczego i o Jej ogromnej pracowitości.

Dobrze zaplanowane badania i zastosowane metody badawcze pozwoliły uzyskać Doktorantce mutanty szczepów typu dzikiego *S. Enteritidis* i *S. Gallinarum* pozbawione ekspresji fimbrii typu 1 (T1F) poprzez insercyjną inaktywację genu *fimH* oraz kasetę DNA z genem *kanR* warunkującym oporność na kanamycynę. Dla insercyjnej inaktywacji genu *fimH*, wymienione szczepy typu dzikiego poddano elektroporacji celem wprowadzenia wektora plazmidowego pKD46 będącego nośnikiem genów faga lambda red, których białkowe produkty odpowiadają za homologiczną rekombinację. Następnie, takie bakterie wysiewano na podłoża LB stałe z dodatkiem odpowiednio ampicyliny i kanamycyny lub płynne (w celu namnożenia bakterii i ich powtórnej elektroporacji służącej wprowadzeniu wymienionej kasety DNA *kanR*). W ten sposób uzyskano kolonie pałeczek *Salmonella* odporne na kanamycynę, w których doszło do wymiany genu *fimH* na kasetę kanamycynową. Uzyskane mutanty pałeczek *S. Enteritidis* *fimH::kan* i *S. Gallinarum* *fimH::kan* (z delecją genu *fimH*) poddano ocenie morfologicznej przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego oraz ocenie szybkości wzrostu. Doktorantka nie wykazała różnic zarówno w wyglądzie pojedynczych kolonii, jak i w

potencjale proliferacyjnym pomiędzy szczepami typu dzikiego a uzyskanymi mutantami. Następnie, w celu wykazania braku T1F na powierzchni uzyskanych mutantów, Doktorantka przeprowadziła analizę ich ekspresji za pomocą cytometrii przepływowej, wykorzystując królicze przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko białku FimH. Ekspresja T1F u badanych mutantów delecyjnych nie przekroczyła 6%, w porównaniu z ponad 60% ekspresją fimbrii typu 1 u szczepów dzikich. Mutanty te służyły określeniu funkcji T1F w oddziaływaniu na komórki pochodzenia nabłonkowego jelit i makrofagi kury. W tym celu przeprowadzono badania nad adhezją pałeczek *S. Enteritidis* i *S. Gallinarum* typu dzikiego oraz ich mutantów pozbawionych ekspresji T1F do ustalonych *in vitro* komórek CHIC-8E11 oraz HD11. Należy dodać, że w przypadku komórek HD11 wykonywane w ocenianej pracy testy obejmowały również komórki traktowane PMA lub LPS. Wykazano, że pałeczki *S. Enteritidis* typu dzikiego wykazywały wysoką adhezję do obu rodzajów komórek, w tym także do komórek HD11 aktywowanych PMA lub LPS. Wykazano również, że adhezja ta była blisko dziesięciokrotnie wyższa w porównaniu z pałeczkami *S. Gallinarum*. Doktorantka wykazała również, że w przypadku *S. Enteritidis* oddziaływania te były efektywnie hamowane przez 0,2 M D-mannozę, czego nie obserwowano w przypadku *S. Gallinarum*. Zgodnie z oczekiwaniami, wykazano, że brak mannozozależnych fimbrii typu 1 (MST1F) na powierzchni zmutowanych pałeczek *S. Enteritidis* *fimH::kan* powodował około 5-krotną redukcję adhezji do komórek obu rodzajów badanych hodowli. Nie zaobserwowano takiego zjawiska w przypadku mutantu *S. Gallinarum* z brakiem mannozoopornych fimbrii typu pierwszego (MRT1F).

Dalsze testy prowadzone przez Doktorantkę dotyczyły inwazyjności zarówno badanych pałeczek *Salmonella* typu dzikiego, jak i ich mutantów, w których wykazano, że wyniki tych testów korespondowały z wynikami testów adhezyjnych. W ten sposób potwierdzono, że w przypadku pałeczek *S. Enteritidis*, kluczowym czynnikiem umożliwiającym ich inwazyjność do komórek kury jest obecność aktywnych MST1F, o czym świadczy spadek liczby CFU, gdy bakterie preinkubowano z 0,2 M D-mannożą w celu inaktywacji T1F oraz eksperymenty, w których wykorzystano zmutowany szczep *S. Enteritidis* *fimH::kan* z delecją genu *fimH*, pozbawiony MST1F. Wykazano zatem związek między inwazyjnością a adhezją z udziałem MST1F, których obecność poprzez stabilizację kontaktu pomiędzy pałeczką *Salmonella* a enterocytem na drodze adhezji, zwiększa efektywność inwazji.

Doktorantka wykazała również, że przeżywalność zarówno pałeczek *S. Enteritidis*, jak i *S. Gallinarum* typu dzikiego i ich mutantów pozbawionych ekspresji T1F, w przypadku zakażenia obu rodzajów komórek jest podobna i oscyluje wokół 100%. Jedynie 3-krotny wzrost przeżywalności zaobserwowano w odniesieniu do wszystkich badanych szczepów *Salmonella*



w przypadku komórek HD11 traktowanych LPS. Dowodzi to, że przeżywalność tych bakterii w makrofagach zależy od stanu czynnościowego komórek. Wykazano także brak efektu cytotoksyczności zakażonych komórek CHIC-8E11, zarówno pałeczkami *S. Enteritidis* i *S. Gallinarum* typu dzikiego, jak i ich mutantami, o czym świadczył brak zwiększonej aktywności dehydrogenazy mleczanowej w pożywce w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Natomiast w odniesieniu do komórek HD11, zarówno wyjściowych, jak i traktowanych PMA lub LPS, pałeczki *S. Enteritidis* powodowały statystycznie istotny wzrost aktywności dehydrogenazy mleczanowej w pożywce, co świadczy o istotnym efekcie cytotoksycznym wywoływanym przez te bakterie. Należy podkreślić, że nie obserwowano różnic pomiędzy pałeczkami *S. Enteritidis* typu dzikiego i ich mutantem, co świadczy o braku wpływu T1F na ten proces. W przeciwieństwie do pałeczek *S. Enteritidis*, pałeczki *S. Gallinarum* nie wpływały na żywotność komórek HD11. Również w przypadku serowaru *S. Gallinarum*, T1F nie brały udziału w procesie cytotoksyczności.

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki badań, a przede wszystkim fakt, że inwazyjność pałeczek *S. Enteritidis* wobec komórek HD11 jest około 10 razy większa niż pałeczek *S. Gallinarum* oraz że pałeczki *S. Enteritidis* są wysoce cytotoksyczne wobec makrofagów, należy stwierdzić, że kolonizacji błony śluzowej jelit przez ten serowar towarzyszą rozległe zmiany zapalne, obejmujące obumieranie licznych komórek, co ułatwia uwalnianie z nich bakterii i zakażenie kolejnych. Natomiast zakażenia powodowane przez *S. Gallinarum* przebiegają bez odczynu zapalnego, co pozwala zakażonym, ale nie uszkodzonym makrofagom na przedostawanie się do krwi i chłonki oraz ich transport tą drogą do narządów wewnętrznych (śledziona i wątroba) i do uogólnienia procesu.

Tekst rozdziału „**Wyniki**” uzupełniony wysokiej jakości tabelami i rycinami przybliży czytającemu wyniki tych bardzo złożonych eksperymentów w sposób przejrzysty i komunikatywny. Chciałbym zaznaczyć, że w tym rozdziale Doktorantka prowadzi dyskusję nad niektórymi wynikami badań własnych, co nie powinno mieć miejsca, gdyż do tego służy rozdział „Dyskusja”, chociaż bez wątplenia ułatwia to interpretację i zrozumienie celowości tych badań.

Kolejna część dysertacji zawiera wnikliwą analizę uzyskanych wyników, popartą licznymi danymi z piśmiennictwa. W mojej opinii jest to autentyczna dyskusja, z której wynika zasadność prowadzenia kolejnych etapów badań dla uzyskania założonego celu. Podkreślam to, gdyż nie często zdarza się by autor dysertacji tak szczegółowo omawiał problematykę, której ona dotyczy. Redakcja tego rozdziału stanowi dowód dużej dojrzałości naukowej Doktorantki, której wyrazem jest umiejętność analizy uzyskanych wyników badań własnych w konfrontacji

z danymi zawartymi w piśmiennictwie, a przede wszystkim dogłębną znajomością literatury przedmiotu.

Na zakończenie Doktorantka formułuje siedem wniosków, które są poprawne i odpowiadają założonym celom badań oraz znajdują pełne odzwierciedlenie w uzyskanych wynikach.

Recenzowaną pracę doktorską oceniam pozytywnie ze względu na jej następujące walory:

- stanowi ona kolejne tak szczegółowe opracowanie naukowe wnoszące nowe dane do patogenyzy zakażeń pałeczkami *Salmonella* nieswoistymi gatunkowo (*S. Enteritidis*) i swoistymi (*S. Gallinarum*), zwłaszcza dotyczące roli fimbrii typu 1 w adhezji i inwazji oraz przeżywalności i cytotoksyczności wymienionych serowarów w kurzych liniach komórkowych;

- badania zrealizowano z zastosowaniem najnowocześniejszych metod, co podnosi jej wartość naukową;

- wiarygodność uzyskanych wyników podnosi fakt użycia w badaniach tak licznych i zawansowanych metod badawczych, w tym biologii molekularnej i cytometrii przepływowej;

- przenosząc uzyskane wyniki badań na grunt zakażeń naturalnych należy stwierdzić, że inwazyjności pałeczek *S. Enteritidis* towarzyszy znaczna cytotoksyczność wobec makrofagów, a co za tym idzie kolonizacja błony śluzowej jelit przez ten serowar prowadzi do rozległych zmian zapalnych z obumieraniem komórek i uwalnianiem z nich bakterii i zakażaniem kolejnych komórek (zakażenie o charakterze lokalnym). Natomiast zakażenia powodowane przez *S. Gallinarum* przebiegają bez odczynu zapalnego, co pozwala zakażonym, ale nie uszkodzonym makrofagom na przedostawanie się do układów krwionośnego i chłonnego oraz ich transport tą drogą do narządów wewnętrznych i do uogólnienia procesu.

Z obowiązku wnikliwego recenzenta pragnę Doktorantce zwrócić uwagę na kilka niedociągnięć dotyczących głównie piśmiennictwa:

- nie zacytowano w manuskrypcie znajdującej się w wykazie piśmiennictwa pracy Dos Santos i wsp. (2020) oraz Galan i Curtiss (1989);

- brak w wykazie piśmiennictwa cytowanych w manuskrypcie prac Duguida i Gillesa (1958), Datsenko i Wanner (2000), Holly i wsp. (2020), Kisiela i wsp. (2005a), Kisiela i wsp. (2006);


- prace autorstwa Duguid i wsp. (1966a i b), Kuźmińska-Bajor i wsp. (2012a i b), Kuźmińska-Bajor i wsp. (2015a i b), Naughton i wsp. (2001a i b) zamieszczono w wykazie piśmiennictwa dwukrotnie pomimo, że są identyczne.



Ponadto na stronie 75 Doktorantka mylnie odwołuje się do ryciny nr 14, której nie ma w wykazie, zamiast do 13.

Przedstawione uwagi krytyczne, które mają wyłącznie charakter porządkowy lub uzupełniający, nie umniejszają wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy i nie wpływają na jej jednoznacznie bardzo pozytywną i wysoką ocenę.

W konkluzji wyrażam opinię, że rozprawa doktorska lek. wet. Agaty Mikołajczyk-Martinez pt. "Rola fimbrii typu 1 w adhezji i inwazji oraz przeżywalności i cytotoksyczności pałeczek *Salmonella Gallinarum* i *Salmonella Enteritidis* wobec kurzych linii komórkowych" odpowiada wymogom zawartym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789), w związku z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r., poz. 1669 ze zm.). Biorąc powyższe pod uwagę przedkładam Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek. wet. Agaty Mikołajczyk-Martinez do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na walory naukowe i poznawcze, wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

  
prof. dr hab. Andrzej Koncicki