Dr hab. Tadeusz Bakuła prof. UWM
Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn 11.04.2023

Opinia o pracy doktorskiej lek. wet. Remigiusza Gałęckiego pt. „Strzyżaki (*Lipoptena* spp.) jako potencjalny wektor chorób zakaźnych ludzi i zwierząt - znaczenie epizoonotyczne na terenie Polski”

Praca doktorska lek. wet. Remigiusza Gałęckiego stanowi cykl 4 artykułów oryginalnych oraz 2 zgłoszeń patentowych. Dwa artykuły zostały opublikowane w czasopiśmie Animals, wydanie specjalne czasopisma: Parasites and Parasitic Diseases, jeden artykuł w czasopiśmie Pathogens wydanie specjalne “Current Research on Infectious Diseases of Domestic Animals in a One Health Perspective” i jeden w czasopiśmie International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife. Sumaryczna liczba punktów MNISW – 400, sumaryczny *Impact Factor* - 11.241.

1. Gałęcki, R., Jaroszewski, J., Xuan, X., & Bakuła, T. (2020). Temporal-microclimatic factors affect the phenology of *Lipoptena fortisetosa* in central European forests. Animals, 10(11), 2012.
   Wydanie specjalne: Parasites and Parasitic Diseases.
   Punkty MNISW - 100. *Impact Factor* - 2.323.
   (Udział procentowy doktoranta - 85%)
2. Gałęcki, R., Xuan, X., Bakuła, T., & Jaroszewski, J. (2021). Molecular Characterization of *Lipoptena fortisetosa* from Environmental Samples Collected in North-Eastern Poland. Animals, 11(4), 1093.
   Wydanie specjalne: Parasites and Parasitic Diseases.
   Punkty MNISW - 100. *Impact Factor* - 2.752.
   (Udział procentowy doktoranta - 85%)
3. Gałęcki, R., Jaroszewski, J., Bakuła, T., Galon, E. M., & Xuan, X. (2021). Molecular Detection of selected pathogens with zoonotic potential in deer keds (*Lipoptena fortisetosa*). Pathogens, 10(3), 324.
   Wydanie specjalne: Current Research on Infectious Diseases of Domestic Animals in a One Health Perspective.
   Punkty MNISW - 100. *Impact Factor* - 3.492.
   (Udział procentowy doktoranta - 84%)
4. Gałęcki, R., Jaroszewski, J., Bakuła, T., & Xuan, X. (2021). Molecular characterization of *Lipoptena cervi* from environmental samples collected in Poland. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 14, 41-47.
   Punkty MNISW - 100. *Impact Factor* - 2.674.
   (Udział procentowy doktoranta - 85%)

Zgłoszenia patentowe:

1. P.439829. Zastosowanie strzyżaków jako biologicznych markerów do wykrywania chorób przenoszonych przez wektory u jeleniowatych

(Udział procentowy doktoranta - 100%)

2. P.439910. Pojemniki do przetrzymywania i transportu ektopasożytów, zwłaszcza muchówek z rodziny *Hippoboscida*e ze środowiska naturalnego
(Udział procentowy doktoranta - 100%)

Lek. wet. Remigiusz Gałęcki w przygotowaniu publikacji odegrał wiodącą rolę już od samego początku, czyli od wyboru tematu doktoratu i opracowania koncepcji pracy badawczej poprzez opracowanie techniki pobierania próbek w terenie, ich transport, opracowanie metodyki badań laboratoryjnych, analizy laboratoryjne, analizy statystyczne oraz bioinformatyczne, interpretację wyników, przygotowania publikacji oraz odpowiedzi na recenzje artykułu. Indywidualny wkład autorski w powstanie artykułów został umieszczony w ich treści.

Głównym celem przeprowadzonych badań była ocena *Lipoptena* spp. jako potencjalnego wektora chorób zakaźnych ludzi i zwierząt na terenie Polski, składał się on z kilku celów szczegółowych w tym:

1) Ocena korelacji między liczebnością *L. fortisetosa* poszukujących żywicieli w środowisku a wybranymi warunkami czasowo-mikroklimatycznymi w lasach na początku okresu poszukiwania żywicieli.
2) Ocena występowania *L. fortisetosa* w północno-wschodniej Polsce
3) określenie związków filogenetycznych z innymi sekwencjami *L. fortisetosa* uzyskanymi w poprzednich badaniach.
4) Identyfikacja materiału genetycznego patogenów o potencjale zoonotycznym u *L. fortisetosa* pozyskanych z żywicieli specyficznych i ze środowiska.
5) Ocena różnic genetycznych między populacjami *L. cervi* oraz określenie związków filogenetycznych z innymi sekwencjami *L. cervi* uzyskanymi w poprzednich badaniach.

Muchówki z rodziny narzępikowatych są obligatoryjnymi, krwiopijnymi ektopasożytami ptaków i ssaków. W Polsce funkcjonuje wiele nazw zwyczajowych, w tym: narzępiki, strzyżaki, wpleszcze. W praktyce lekarsko-weterynaryjnej często można usłyszeć nazwę „latające kleszcze", co może być spowodowane podobieństwem tych owadów i kleszczy w wyglądzie oraz poruszaniu się po ciele. Doktorant w rozprawie doktorskiej starał się wyjaśnić polską etymologię nazw gatunkowych opisywanych ektopasożytów.

Opisywane owady należą do rzędu Diptera, rodziny Hippoboscidae w której wyróżniamy 2 rodzaje: *Hippobosca* spp. i *Lipoptena* spp. Dotychczas opisano 11 gatunków z rodzaju *Hippobosca* spp. w tym: *H. camelina, H. equina, H. fulva, H. hirsuta, H. longipennis, H. rufipes, H. variegata* występujących na terenie Azji, Afryki i Bliskim Wschodzie. Sporadycznie stwierdzane są w Europie, z wyjątkiem *H. equina*, która dość powszechnie atakuje konie i przeżuwacze. Preferencje związane z gatunkiem żywiciela tych muchówek są różne, np. *H. equina* pasożytuje głównie na koniach, rzadziej na zwierzętach gospodarskich. Rodzaj *Lipoptena* spp., do którego zaliczamy *L. cervi, L. capreoli, L. depressa, L. fortisetosa*, występuje na terenie Europy, Syberii i Chin. Cechą charakterystyczną tego rodzaju jest odrzucanie skrzydeł po znalezieniu żywiciela ostatecznego. Rozmnażają się tylko na żywicielu specyficznym, którym są dziko żyjące przeżuwacze. Aktualne badania wskazują jednak, że coraz częściej zdarzają się loty tych ektopasożytów na żywicieli niespecyficznych. Opisywane owady posiadają niezwykle ciekawy cykl rozwojowy. Muchówki z rodziny Hippoboscidae są jajożyworodne. Kopulacja przebiega na żywicielu, trwa od 3 do 13 min,

a cały rozwój odbywa się w jajowodzie. Larwy wykluwają się po ok. tygodniu. Pobierają one przez przełyk płyn produkowany w gruczołach mlecznych znajdujących się w ścianie jajowodu samicy. Część zużywają do swojego rozwoju, a część magazynują w przewodzie pokarmowym. Linieją kilkukrotnie, a ostatnia zachowana wylinka twardnieje na poczwarce, tworząc puparium. Przepoczwarzenie trwa ok. 1 godz., a poczwarki pozostają na ciele żywiciela lub spadają na ziemię. Czas rozwoju zależy głównie od temperatury otoczenia, np. w ciepłym klimacie rozwój trwa do 30 dni, a w umiarkowanym − 270- 370 dni, w którym wyróżniamy okres diapauzy zimowej. Dorosły osobnik (imago) po przepoczwarzeniu szuka żywiciela.

Lek. wet. Remigiusz Gałęcki słusznie zauważył, że opisywane ektopasożyty zostały w dużej mierze zaniedbane w polskich badaniach, a potencjalnie ważne dane genetyczne, w tym różnorodność genetyczna, z terenu Europy Środkowej są skąpe. Większość polskich badań *L. fortisetosa* opierała się na analizach makroskopowych, dlatego genetyczna i filogenetyczna charakterystyka gatunku, w tym genu rRNA 16S DNA, pozostała niezbadana. Ponadto lokalizacje skolonizowane przez *L. fortisetosa* w północno-wschodniej Polsce nie zostały dotychczas zbadane.

Miesiące letnie związane są ze zwiększoną ekstensywnością wielu ektopasożytów, w tym kleszczy, komarów i meszek. W tym okresie stwierdza się również wzrost aktywności narzępików. Pierwsze loty tych muchówek zaczynają się od czerwca i trwać mogą do września-października. Najwcześniej zaobserwować można *L. fortisetosa* (nawet w połowie maja). *Lipoptena* spp. występuje dość licznie na terenie całego kraju, szczególnie w województwach o dużym zalesieniu. Miejscem ich bytowania są lasy, zwłaszcza bogate w zwierzynę płową. Owady te mogą występować ogniskowo ze względu na specyficzne cechy mikroklimatu (np. zacienienie, wysoka wilgotność). Obserwowalny jest stały wzrost populacji muchówek w środowisku oraz ich migracje z ekosystemu leśnego do miast. Ich loty, żerowanie i cykl życiowy są ściśle związane z wysoką temperaturą i wilgotnością. Wraz ze wzrostem tych czynników zauważalna jest zwiększająca się aktywność tych owadów. Na korzyść dla muchówek działają zauważalne zmiany klimatyczne. Skutkuje to migracją niektórych gatunków ektopasożytów na tereny, na których do tej pory ich nie stwierdzano lub występowały bardzo rzadko. Powoduje to też prawdopodobieństwo przesunięcia się granicy występowania lub znacznym wzrostem ich liczby ze względu na stałe wyższe temperatury w Polsce. Dlatego też muchówki ze względu na okresowe występowanie, w dużym stopniu zależne od warunków pogodowych, stanowią coraz ważniejsze, periodyczne zagrożenie dla zwierząt i ludzi.

Dane do badań nad fenologią *L. fortisetosa* lek wet. Remigiusz Gałęcki pozyskiwał w okresie od 6 maja do 15 lipca 2019 i 2020 roku w naturalnym lesie mieszanym Warmii i Mazur na terenie gminy Olsztynek. W trakcie badań rejestrował liczbę zebranych strzyżaków, datę pobrania próbki (czas w dniach), temperaturę (ºC), wilgotność względną (%), ciśnienie powietrza (hPa) i prędkość wiatru (km/h). Dodatkowo, ektopasożyty monitorowano w następujących gminach: Ełk, Gołdap, Kolno, Jedwabno, Pieniężno i Ruciane-Nida. Próbki pozyskane w trakcie badań terenowych zostały ocenione filogenetycznie. Badania te stanowią pierwszy na świecie opis wpływu badanych warunków na loty *L. fortisetosa* w środowisku leśnym i pierwszą w Polsce analizę filogenetyczną tego gatunku owada.

Materiał do badań tj. próbki *L. fortisetosa*, które były oceniane pod kątem obecności wybranych patogenów, doktorant pozyskiwał ze środowiska i od zwierząt w pięciu województwach: wielkopolskim, kujawsko-pomorskim, lubuskim, pomorskim i warmińsko-mazurskim. Na pobranych owadach ze wspomnianych lokalizacji wykonał molekularną identyfikacja wybranych patogenów o potencjale zoonotycznym. Dodatkowo zebrany materiał tj. próbki *L. cervi* posłużyły do oceny filogenetycznej populacji tego owada.

Do badań molekularnych nad próbkami *L. fortisetosa* i *L. cervi* pozyskanych z różnych regionów Polski wykorzystał gen 16S rRNA. Uzyskane wyniki poddał analizie filogenetycznej. Pozyskane w trakcie badań DNA przeanalizował na obecność następujących patogenów: *Anaplasma ovis*, *Anaplasma phagocytophilum, Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Borellia* spp., *Coxiella burnetii*, *Francisiella tularensis*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia* spp. i *Theileria* spp. Zgodnie z aktualną wiedzą były to pierwsze, tak szerokie, badania obejmujące *L. fortisetosa* jako potencjalny wektor chorób zakaźnych w Europie.

Wyniki badań przedstawionych przez lek. wet. Remigiusza Gałęckiego dostarczają dowodów na to, że populacje *L. fortisetosa* w Europie Środkowej mają różne linie genetyczne, wskazują również, że *L. fortisetosa* utworzyły stabilne i zróżnicowane genetycznie populacje w całej Polsce. Zidentyfikowane sekwencje wskazują, że populacja *L. fortisetosa* kontynuuje rozprzestrzenianie się pomimo ograniczeń geograficznych.

Prezentowane badania ujawniają zmienność genetyczną w genie 16S rRNA populacji *L.fortisetosa* i *L. cervi* w wybranych województwach Polski. Badane regiony były skolonizowane przez dwa dominujące haplotypy *L. cervi,* które również zidentyfikowano w innych krajach Europy Środkowej, a lokalne haplotypy Doktorant wykrył w pojedynczych przypadkach. Brak istotnych powiązań z sekwencjami uzyskanymi w regionach położonych na zachód od stanowisk badawczych (na zachód od rzeki Odry) sugeruje obecność innych populacji genetycznych w Europie.

Zdaniem lek wet. Remigiusza Gałęckiego wyselekcjonowany materiał genetyczny różnych patogenów potwierdza, że strzyżaki mogą być potencjalnym wektorem chorób zakaźnych, a dzięki wykryciu materiału genetycznego wybranych patogenów mogą być używane jako markery biologiczne do identyfikacji patogenów w populacjach jeleniowatych.

Obserwowane obecnie zmiany klimatyczne doprowadziły do zmian w dynamice populacji zwierząt, a także pojawienia się nowych gatunków w miejscach, gdzie nigdy nie występowały. Procesy te znacząco zwiększyły populację ektopasożytów w Europie, w tym wzrosła również populacja muchówek z rodziny Hippoboscidae. Należy podkreślić, że populacja dzikich zwierząt kopytnych w Polsce stale rośnie. Na szczególną uwagę zasługuje wysoki wzrost liczebności jeleniowatych. Strzyżaki są pasożytami o wąskim zakresie żywicieli i są bezpośrednio związane z jeleniowatymi, ale stwierdzono również, że *Lipoptena spp*. kolonizuje żubry oraz spotykano je na niespecyficznych żywicielach, takich jak zwierzęta towarzyszące, a także u zwierząt gospodarskich (koniach i bydle). Dlatego też, tak istotnym było przeprowadzenie badań nad *L. fortisetosa*, która na terytorium Europy Środkowej jest uznawana za gatunek inwazyjny.

Przedstawiona rozprawa doktorska lek. wet. Remigiusza Gałęckiego poza istotnym wkładem poznawczym w zakresie występowania i roli strzyżaków w Polsce ma również charakter aplikacyjny poprzez zgłoszenie patentowe związane z pozyskiwaniem i transportem pobranych próbek w terenie oraz realną do zastosowania praktycznego metodą do wykrywania chorób przenoszonych przez wektory u jeleniowatych poprzez zidentyfikowanie strzyżaków, jako biologicznych markerów stanowiących dodatkowy materiał badawczy łatwy do pozyskania, transportu i przechowywania.

Pozyskana wiedza dotycząca tych owadów, w związku z przesunięciem granicy ich występowania, jest istotna dla lekarzy weterynarii oraz właścicieli zwierząt. Z uwagi na niską świadomość społeczną, należało przeprowadzić rzetelne badania naukowe, które pozwoliły na zmniejszenie szerzenia dezinformacji odnośnie tych ektopasożytów. Zwierzęta, które często chodzą po zalesionych terenach lub bytują w okolicach lasów, powinny być regularnie zabezpieczane/badane w celu zminimalizowania narażenia na loty strzyżaków.

Ponadto po infestacji zwierzęta powinny zostać przebadane pod kątem ewentualnych patogenów przenoszonych przez te owady. W świetle dotychczasowych badań, w trakcie diagnostyki różnicowej należy brać pod uwagę infestacje muchówkami w przypadku przewlekłego świądowego zapalenia skóry lub innych atopowych reakcji skórnych. Co ciekawe, Doktorant jako pierwszy identyfikuje strzyżaki jako szkodniki w gospodarce łowieckiej, sugeruje jak japońska linia genetyczna dostała się na terytorium Polski oraz proponuje polską nazwę dla *L. fortisetosa* (strzyżak azjatycki).

W mojej ocenie praca doktorska lek. wet. Remigiusza Gałęckiego jest przygotowana poprawnie, w oparciu o prawidłowo zaplanowane i przeprowadzone doświadczenia, a uzyskane wyniki zostały dobrze opracowane bioinformatycznie, statystycznie i poprawnie zinterpretowane. Przedstawiona rozprawa doktorska w istotny sposób powiększa aktualny stan wiedzy i stanowi podstawę do wdrożenia wyników w praktyce lekarsko-weterynaryjnej. Praca ta wpisuje się w idee „One Health" z uwagi na fakt, że owady te stanowić mogą potencjalny czynnik łączący środowisko, zwierzęta dzikie, zwierzęta gospodarskie i towarzyszące a na końcu człowieka w przepływie patogenów. Przedstawiona rozprawa doktorska stanowi także istotny wkład w rozwój entomologii weterynaryjnej. Praca jest w pełni oryginalna i nie narusza praw osób trzecich.

Uważam, że przygotowana przez lek. wet. Remigiusza Gałęckiego praca doktorska jest wynikiem samodzielnej i rygorystycznej pracy, a poziom publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej jest wysoki, co potwierdza opublikowanie wszystkich prac w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Godnym pochwały jest również międzynarodowe zaangażowanie w pracę badawczą z instytucją akredytowaną przez OIE. Przedstawiona przez Doktoranta rozprawa doktorska świadczy o jego umiejętnościach samodzielnego prowadzenia badań naukowych od konceptualizacji do przedstawienia wyników badań i dyskusji, spełniając tym samym wymogi stawiane osobom ubiegającym się o stopień naukowy doktora.

Przedstawiona rozprawa doktorska potwierdza, że lek. wet. Remigiusz Gałęcki posiada ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie weterynaria oraz posiada umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Potwierdzeniem tego jest również dorobek Doktoranta o łącznej liczbie 1762 punktów MNiSW, udział w 5 projektach badawczych oraz kierowanie projektem naukowym Lider XII w ramach konkursu NCBiR.

We wniosku końcowym stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. wet. Remigiusza Gałęckiego pt. „Strzyżaki (*Lipoptena* spp.) jako potencjalny wektor chorób zakaźnych ludzi i zwierząt - znaczenie epizoonotyczne na terenie Polski" spełnia wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z dnia 16.04.2004 r. z późn. zm.) oraz Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. Nr 204, poz. 1200).

Dr hab. Tadeusz Bakuła prof. UWM

