SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO
W WARSZAWIE
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Warszawa, dnia 18.07.2023 r.

Dr hab. Anna Pyziel-Serafin, prof. SGGW
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Prof. dr hab. Tomasz Maślanka
Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

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

Zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 12.06.2023 r. oraz w oparciu o Ustawę z dnia 20.07.2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023, poz. 742) dokonałam recenzji pracy doktorskiej lek. wet. Remigiusza Gałęckiego pt.: ”Strzyżaki (*Lipoptena* spp.) jako potencjalny wektor chorób zakaźnych ludzi i zwierząt - znaczenie epizoonotyczne na terenie Polski”.

Ocenianą rozprawę doktorską stanowi **zbiór czterech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych**, które ukazały się w latach 2020-2021 w czasopismach o uznanej renomie w środowisku parazytologów weterynaryjnych.

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 MEiN - 100. *Impact Factor* - 2.323.
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 MEiN - 100. *Impact Factor* - 2.752.

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 MEiN - 100. *Impact Factor* - 3.492.
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 MEiN - 100. *Impact Factor* - 2.674.

Dodatkowo realizacja zadań badawczych w ramach pracy doktorskiej doprowadziła do złożenia dwóch zgłoszeń patentowych.

1. P.439829. Zastosowanie strzyżaków jako biologicznych markerów do wykrywania chorób przenoszonych przez wektory u jeleniowatych.
2. P.439910. Pojemniki do przetrzymywania i transportu ektopasożytów, zwłaszcza muchówek
   z rodziny Hippoboscidae ze środowiska naturalnego.

Publikacje naukowe stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej lek. wet. Remigiusz Gałęckiego są opracowaniami wieloautorskimi, przygotowanymi w ramach współpracy międzynarodowej, w których Doktorant jest zarówno pierwszym autorem, jak i autorem do korespondencji. Wiodący udział Doktoranta w powstaniu ww. publikacji, szacowany na poziomie 84-85%, potwierdzają oświadczenia wszystkich Współautorów.

Każda z publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej została opublikowana w czasopiśmie z listy *Journal Citation Report*, gwarantując przejście przez wnikliwą i rzeczową recenzję merytoryczną i korektę edytorską. Ich łączny współczynnik wpływu (IF) wynosi 11,241, a liczba punktów MEiN 400.

Złożona do oceny rozprawa doktorska liczy 76 stron i składa się z 12 rozdziałów.
Rozpoczyna ją strona tytułowa i przedstawione na str. 3 dane bibliograficzne czterech artykułów naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, ich łączne: IF i punktacja MEiN oraz numery i nazwy dwóch zgłoszonych patentów.
Kolejna strona zawiera podziękowania dla Promotora i Współpracowników oraz wykaz podmiotów, które współfinansowały badania przeprowadzone przez Doktoranta.
Spis treści rozprawy umieszczono na str. 5-6, natomiast jej streszczenie w języku polskim (rozdz. 1) na str. 7-8, a streszczenie w języku angielskim (rozdz. 2) na str. 9 i 10.
Skróty użyte w treści rozprawy wykazano na str. 11 (rozdz. 3).
Na str. 12-24 można znaleźć Wprowadzenie (rozdz. 4), które zostało podzielone na 8 podrozdziałów dotyczących taksonomii, etymologii nazewnictwa, występowania strzyżaków, opisu wybranych cech morfologicznych *Lipoptena* spp., *L. cervi*, *L. fortisetosa*, cyklu rozwojowego *Lipoptena* spp. i fenologii występowania, znaczenia strzyżaków w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej, zasadności podjętych badań, ich potencjału wdrożeniowego oraz czterech celów badawczych.

Kolejno, na str. 24-32, opisano Materiały i metody (rozdz. 5), wyodrębniając 4 podrozdziały dotyczące badań nad fenologią występowania *L. fortisetosa* w środowisku, charakterystyki molekularnej próbek *L. fortisetosa* pozyskanych ze środowiska w północno-wschodniej Polsce, charakterystyki molekularnej próbek *L. cervi* pozyskanych ze środowiska w Polsce oraz molekularnej identyfikacji wybranych patogenów o potencjale zoonotycznym u *L. fortisetosa*.
Wyniki badań (rozdz. 6) opisano na str. 32-56, wyodrębniając 4 podrozdziały dotyczące czynników temporalno-mikroklimatycznych wpływających na fenologię *L. fertisetosa* w Europie Środkowej, charakterystyki molekularnej osobników *L. fortisetosa* pozyskanych ze środowiska w północno-wschodniej Polsce, charakterystyki molekularnej osobników *L. cervi* pozyskanych ze środowiska w Polsce, molekularnej identyfikacji wybranych patogenów o potencjale zoonotycznym u *L. fortisetosa*.
Na str. 56-63 rozprawy przestawiono Dyskusję nad uzyskanymi wynikami (rozdz. 7) w kontekście doniesień innych autorów.
Kolejno, na str. 63-65 omówiono Aspekt wdrożeniowy uzyskanych wyników (rozdz. 8), wyodrębniając zastosowanie strzyżaków jako biologicznych markerów chorób przenoszonych przez wektory u jeleniowatych oraz zagadnienie dotyczące zaprojektowania pojemników do przetrzymywania i transportu ektopasożytów, zwłaszcza muchówek z rodziny Hippoboscidae ze środowiska naturalnego.
Podsumowanie badań (rozdz. 9) przedstawiono na str. 65-66.
Na stronie 67 wymieniono 15 wniosków płynących z pracy (rozdz. 10).
Na str. 68-76 wymieniono 150 pozycji piśmiennictwa (rozdz. 11).
Od str. 77 rozpoczyna się część rozprawy zawierająca oświadczenia czterech Współautorów dotyczące wyrażenia zgody na wykorzystanie publikacji w rozprawie doktorskiej lek. wet. Remigiusza Gałęckiego oraz wiodącego udziału Doktoranta w ich przygotowaniu. Kolejno do rozprawy dołączono kopie czterech, powiązanych tematycznie oryginalnych artykułów naukowych oraz potwierdzenie z Urzędu Patentowego RP o przyjęciu wniosków o udzielenie patentów na dwa wynalazki (zgłoszenia o numerach P.439829 z dnia 14.12.2021 r. i P.439910 z dnia 20.12.2021 r.).

Problem naukowy, jego sformułowanie i aktualność podjętego zagadnienia naukowego

Strzyżaki z rodzaju *Lipoptena* są obligatoryjnymi ektopasożytami ptaków i ssaków, spędzającymi większość swojego dorosłego życia na żywicielu, żywiąc się jego krwią. W skład rodzaju *Lipoptena* wchodzą 32 gatunki, z których największą rolę w Polsce odgrywają *L. cervi*, gatunek rodzimy z obszaru Palearktyki oraz *L. fortisetosa*, gatunek obcy, inwazyjny, pochodzący ze wschodniej Palearktyki. Warto zaznaczyć, że *L. fortisetosa* stale poszerza swój zasięg w Europie, w tym na terenie Polski, gdzie gatunek ten został po raz pierwszy zaobserwowany w 1989 r. Obydwa gatunki pasożytują na jeleniowatych, które są dla nich żywicielami specyficznymi. Notowana dotychczas w Polsce prewalencja zarażenia tej grupy żywicieli jest wysoka i waha się od 64% do 78%. Obecność *Lipoptena* spp. zanotowano także u żubrów, zwierząt towarzyszących i gospodarskich. Coraz częściej stwierdza się także przypadkowe infestacje u ludzi. Żywiciele wykazują głównie objawy dermatologiczne, takie jak wyłysienia, stany zapalne skóry, ale także miejscowe lub ogólne objawy nadwrażliwości, włączając alergiczny nieżyt nosa i spojówek, czy nawet wstrząs anafilaktyczny. Oprócz tego,

jako hematofagi, owady te mogą odgrywać rolę wektorów patogenów ludzi i zwierząt. W materiale genetycznym wyizolowanym z osobników *L. cervi* z terenu Warmii i Mazur, wykryto obecność sekwencji nukleotydowych odpowiadających *Bartonella* spp. Doniesienia spoza Polski podają dowody molekularne na przenoszenie przez muchówki takich patogenów z takich rodzajów jak *Anaplasma*, *Borrelia*, *Coxiella*-like, *Theileria* i *Trypanosoma*. Należy pamiętać, że wektory mogą przenosić bakterie, wirusy, pierwotniaki czy pasożytnicze nicienie między zwierzętami wolno żyjącymi a udomowionymi, czy w końcu między zwierzętami i ludźmi, stając się źródłem zakażenia/zarażenia patogenami o znaczeniu zoonotycznym. Wspomniane zagadnienie wpisuje się w koncepcję „Jedno Zdrowie" (One Health), która odnosi się do ochrony zdrowia człowieka przy współdziałaniu ochrony zdrowia zwierząt i uwzględnieniu wpływu środowiska naturalnego na zdrowie ludzi i zwierząt. Zważywszy na powyższe, wybór tematu rozprawy uważam za bardzo dobrze przemyślany i trafny. Doktorant zauważył lukę badawczą w zakresie znaczenia *Lipoptena* spp. w potencjalnym przenoszeniu czynników zakaźnych ludzi i zwierząt, i z sukcesem ją wykorzystał podczas projektowania badań i realizacji pracy doktorskiej. Doktorat wyodrębnił cztery cele badawcze rozprawy, z których każdy odzwierciedla tematykę poszczególnych publikacji wchodzących w skład rozprawy.

Pierwszy z postawionych celów badawczych dotyczy oceny korelacji między liczebnością osobników *L. fortisetosa* poszukujących żywicieli w środowisku a wybranymi warunkami czasowo-mikroklimatycznymi w lasach na początku ich aktywności.

Drugi cel badawczy dotyczy potwierdzenia występowania *L. fortisetosa* w północno-wschodniej Polsce oraz określenie związków filogenetycznych z innymi sekwencjami *L. fortisetosa* uzyskanymi w poprzednich badaniach.

Trzeci cel badawczy dotyczy oceny różnic genetycznych między populacjami *L. cervi* oraz określenie związków filogenetycznych z innymi sekwencjami *L. cervi* uzyskanymi w poprzednich badaniach.

Czwarty cel badawczy dotyczy identyfikacji materiału genetycznego patogenów o potencjale zoonotycznym (*Anaplasma ovis*, *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Borrelia* spp., *Coxiella* spp., *Francisiella tularensis*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia* spp., i *Theileria* spp.) u *L. fortisetosa* pozyskanych z żywicieli specyficznych oraz środowiska.

Wymienione cele badawcze uważam za słuszne obrane, ze względu na:

- brak danych literaturowych dotyczących wpływu wybranych czynników klimatycznych na liczebność populacji i aktywność *L. fortisetosa* w lasach, które są ich naturalnym biotopem,
- skąpe dane literaturowe z terenu Polski potwierdzające gatunek z rodzaju *Lipoptena* z użyciem technik biologii molekularnej,
- brak danych literaturowych z terenu Polski dotyczących analizy różnorodności genetycznej *L. cervi* i *L. fortisetosa*, która pozwala na prześledzenie pochodzenia geograficznego genotypów,

- brak danych literaturowych z terenu Polski dotyczących potencjalnych patogenów ludzi i zwierząt przenoszonych przez *L. fortisetosa*,
- spędzanie przez strzyżaki całego swojego życia na jednym osobniku żywicielskim, co czyni je świetnymi kandydatami na biologiczne markery chorób przenoszonych przez wektory,
- obserwowany wzrost populacji jeleniowatych w Polskich lasach, który sprzyja wzrostowi zagrożenia patogenami przenoszonymi przez wektory,
- zwiększenie zagrożenia związanego z zawleczeniem nowych gatunków strzyżaków i przenoszonych przez nie patogenów wraz z migracjami jeleniowatych między krajami.

Ocena znajomości literatury dotyczącej problematyki badań

Należy uznać, że Doktorant w pełni prawidłowo wykorzystał bogate źródła piśmiennictwa, obejmujące 150 pozycji, datowanych na lata 1844-2021. Doktorant dokładnie prześledził rys historyczny rozwoju wiedzy na temat przedstawicieli rodziny Hippoboscidae oraz dynamikę poszerzania zasięgu geograficznego dwóch gatunków muchówek z rodzaju *Lipoptena* na przestrzeni dziesięcioleci. Lek. wet. Remigiusz Gałęcki wykazał się także znajomością najnowszej literatury z badanego zakresu tematycznego, o czym świadczy fakt, że aż 77 cytowanych w rozprawie publikacji (51%) ukazało się po 2010 r.

O dokładnym zgłębieniu przez lek. wet. Remigiusza Gałęckiego literatury przedmiotowej dotyczącej systematyki, biologii, morfologii i zasięgu występowania strzyżaków z rodzaju *Lipoptena* oraz metod badawczych służących zarówno diagnostyce ich gatunku, jak i rodzaju przenoszonych przez nie patogenów, świadczy właściwe wyznaczenie celów badawczych, które zostały skrupulatnie zrealizowane w rozprawie. Tym samym, otrzymane przez Doktoranta wyniki zapełniły szereg białych plam w wiedzy na temat ektopasożytów z rodzaju *Lipoptena*, szczególnie gatunku *L. fortisetosa*.

Poprawność i oryginalność metodyczna oraz zakres rozwiązania zagadnienia naukowego

Badania naukowe zostały zaprojektowane i przeprowadzone przez Doktoranta w prawidłowy sposób, zgodnie z obowiązującymi standardami dla każdej z wybranych procedur. Doktorant wykazał się wiedzą metodyczną na każdym etapie badań, jak również umiejętnością samodzielnego prowadzenia prac badawczych. Zastosowane metody zostały oparte na danych literaturowych i chociaż przez to nie były oryginalne, umożliwiły realizację nowatorskich celów rozprawy, gdyż zostały zaadaptowane do nowych modeli badawczych.

Lek. wet. Remigiusz Gałęcki przeprowadził **pierwsze w Europie Środkowej badania nad fenologią *L. fortisetosa***, które potwierdziły występowanie korelacji między czynnikami czasowo-mikroklimatycznymi a liczbą muchówek poszukujących nowych żywicieli w biotopie leśnym. Tym samym wskazał czynniki sprzyjające aktywności i liczebności tych obcych, inwazyjnych strzyżaków. Do tych czynników należały: temperatura w zakresie 17-22ºC, prędkość wiatru oscylująca między 4 a 12 km/h czy wilgotność powietrza w przedziale 70-80%. Monitorowanie ww. parametrów może odegrać rolę w prognozowaniu zmian liczebności populacji muchówek tego gatunku w naszym kraju, szczególnie zważając na to, że należy się

spodziewać jej wzrostu kosztem liczebności rodzimego gatunku, *L. cervi*. W czasie prowadzonych w lasach Warmii i Mazur analiz, Doktorant oszacował udział procentowy gatunku inwazyjnego, *L. fortisetosa,* na 20,1%, co może stanowić punkt odniesienia do obserwacji dynamiki rozwoju tej populacji w przyszłości.

Doktorant dokonał molekularnego potwierdzenia gatunku badanych strzyżaków na podstawie analizy fragmentu genu mitochondrialnego 16S rRNA analizowanych owadów. Badania doprowadziły do publikacji 18 sekwencji nukleotydowych *L. fortisetosa* o długości od 473 pz do 517 pz. **Są to pierwsze z terenu Polski dane molekularne dotyczące tego gatunku muchówek**. **Jednocześnie Doktorant dokonał drugiej w Polsce rejestracji *L. fortisetosa* i zaproponował polską nazwę wspomnianego gatunku, strzyżak azjatycki.** Badania doprowadziły także do publikacji 8 sekwencji nukleotydowych *L. cervi* o długości od 550 pz do 552 pz. **Są to drugie z terenu Polski dane molekularne dotyczące *L. cervi*.**

Na podstawie sekwencji nukleotydowej fragmentu genu mitochondrialnego 16S rRNA muchówek, Doktorant przeprowadził analizy filogenetyczne dla różnych izolatów *L. cervi* i *L. fortisetosa*, analizując ich pokrewieństwo genetyczne.

Doktorant wytypował 10 patogenów, których sekwencji nukleotydowych poszukiwał w DNA całkowitym wyizolowanym z osobników *L. fortisetosa*. W badaniach wykorzystano dostępne w literaturze startery reakcji PCR komplementarne do sekwencji nukleotydowych zlokalizowanych w obrębie 6 genów, zarówno jądrowych, jak i mitochondrialnych. Należy docenić Doktoranta za zebranie i zaimplementowanie metod badawczych opisanych w literaturze do oceny zagrożenia jakie stanowi *L. fortisetosa* jako wektor patogenów ludzi i zwierząt. **Przedstawione wyniki są pionierskie w skali Polski.** W wyniku przeprowadzonych analiz Doktorant wykazał obecność 9 z 10 analizowanych patogenów u *L. fortisetosa*. Dwa z nich stanowią pasożytnicze pierwotniaki (*Babesia* i *Theileria*), natomiast pozostałe należą do bakterii (*Anaplasma*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Francisella*, *Mycoplasma*, *Rickettsia*). **Do jednego z największych osiągnięć Doktoranta należy pierwsza na świecie rejestracja obecności materiału genetycznego *Babesia* spp. u *L. fortisetosa* (GenBank: MT350573, MW522567).**

Badania z użyciem technik biologii molekularnej pozwoliły na uzyskanie przez Doktoranta 38 sekwencji nukleotydowych, które opublikowano w bazie GenBank (NCBI: National Library of Medicine).

Przydatność uzyskanych wyników w praktyce

Doktorant zwrócił uwagę na konieczność monitorowania składu gatunkowego muchówek z rodzaju *Lipoptena*, ze względu na możliwy wzrost znaczenia gatunku inwazyjnego *L. fortisetosa* kosztem rodzimego *L. cervi*. Należy przy tym zauważyć, że wpływ *L. fortisetosa* na rodzime populacje jeleniowatych pozostaje dotychczas nieznany, sugerując zasadność podjęcia badań monitorujących wspomniane zjawisko w przyszłości.

W świetle przedstawionych przez Doktoranta wyników, wartym rozważenia jest potencjalne wykorzystanie strzyżaków, jako biologicznych markerów chorób przenoszonych przez wektory w populacjach jeleniowatych.

W ramach realizacji rozprawy doktorskiej Doktorant opracował pojemniki, które pozwalają na nieinwazyjne przenoszenie żywych owadów do laboratorium czy hodowli. Wykorzystanie wynalazku pozwala na przedłużenie żywotności muchówek do 96 godzin.

Uwagi polemiczne i dyskusja

Rozprawa rzuca nowe światło na możliwość rozwiązanie ciekawego poznawczo i ważnego praktycznie problemu naukowego, jakim jest znaczenie epizoonotyczne strzyżaków z rodzaju *Lipoptena* na terenie Polski.

Chociaż bardzo wysoko oceniam wartość naukową przedstawionej do recenzji rozprawy, niemniej z obowiązku recenzenta i ciekawości naukowej, chciałabym zwrócić uwagę Doktoranta na kilka kwestii, w tym dotyczących użycia nomenklatury parazytologicznej, metodyki badań z użyciem technik biologii molekularnej oraz kierunku rozwoju omawianych badań w przyszłości.

- Doktorant kilkakrotnie użył nieprawidłowo terminu parazytologicznego „gospodarz" zamiast terminu „żywiciel" (str. 21, 23, 58, 59, 61, 62 rozprawy). Według Słownika Parazytologicznego pod red. J. Złotorzyckiej z 1998 r., wydanego nakładem PTP: „Gospodarz (host) termin stosowany w odniesieniu do organizmów, w których lub na których osiedlają się organizmy symbiotyczne, a nie pasożyty. Nie należy go używać jako synonimu pojęcia żywiciel. To rozróżnienie nie występuje w terminologii angielskiej".
- Do badań związanych z przenoszeniem wybranych patogenów włączono tylko jeden gatunek strzyżaków, *L. fortisetosa*. Z tego względu uważam, że tytuł rozprawy nie w pełni odzwierciedla jej treść, co oczywiście nie umniejsza wartości przeprowadzonych badań.
- Czy rzeczywiście objętość oczyszczanego produktu PCR przed sekwencjonowaniem wynosiła tylko 25 µl?
- Czy Doktorant planuje zaprojektowanie własnych starterów reakcji PCR dla poszukiwanych patogenów, tak aby docelowo zmniejszyć ilość badanych markerów genetycznych, opierając się na najbardziej konserwatywnych dla bakterii i pasożytów? Pozwoliłoby to uporządkować nieco metodykę.
- Czy Doktorant planuje zaprojektowanie testów genetycznych, np. w oparciu o metodę multipleks PCR? Mogłoby to usprawnić diagnostykę molekularną wybranych patogenów z pominięciem konieczności każdorazowego sekwencjonowania produktu PCR.

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187.2. Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym (Dz. U. 2023 poz. 742). Stanowi ona wyjątkowo cenne, oryginalne osiągnięcie naukowe lek. wet. Remigiusza Gałęckiego, wskazując na ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta, a także Jego umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy badawczej.

W związku z powyższym przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Weterynaria, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, wniosek o dopuszczenia Pana lek. wet. Remigiusza Gałęckiego do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Jednocześnie zgłaszam **wniosek o wyróżnienie** powyższej rozprawy doktorskiej ze względu na jej **nowatorski i aplikacyjny charakter**.

Dr hab. Anna Pyziel-Serafin, prof. SGGW