Prof. dr hab. Krzysztof Tomczuk
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Katedra Parazytologii i Chorób Ryb
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin 08.08.2023

RECENZJA

dysertacji doktorskiej Pana lek. wet. Remigiusza Gałęckiego

pt. „Strzyżaki (Lipoptena spp.) jako potencjalny wektor chorób zakaźnych ludzi i zwierząt - znaczenie epizoonotyczne na terenie Polski"

"Deer keds (Lipoptena spp.) as a potential vector of infectious diseases in humans and animals - epizoonotic significance in Poland"

wykonanej pod kierunkiem naukowym dra hab. Tadeusza Bakuły, prof. UWM
w Katedrze Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Strzyżaki z rodzaju Lipoptena są mało poznanymi i niedocenianymi pasożytami zwierząt wolnożyjących i człowieka o dużym potencjale zasiedlania nowych środowisk a przez to zagrażające zdrowiu wielu żywicieli w tym człowieka. Ich potencjał zoonotyczny jest najczęściej porównywany do inwazji kleszczy, włącznie ze zwyczajową potoczną nazwą „kleszcze latające". Ten fakt wnosi wiele nieporozumień, uproszeń i przekłamań co do rzeczywistej roli strzyżyków w środowisku. Niszowy charakter prowadzonych dotychczas badań sprawia, że dane dotyczące prewalencji jak i różnorodności gatunkowej analizowanych pasożytów są rzadko aktualizowane. Problem jest wyjątkowo aktualny, gdyż dotyczy zmieniających się na naszych oczach uwarunkowań klimatycznych w dobie ocieplania się klimatu. Nieznana jest także różnorodność genetyczna poszczególnych gatunków w postaci zróżnicowanych haplotypów. Ich identyfikacja daje możliwości śledzenia dróg rozprzestrzeniania się tych oryginalnych muchówek a także przewidywania kolejnych etapów kolonizacji nowych środowisk. Dodatkowo nie wyjaśniona jest rzeczywista rola strzyżyków w transmisji wielu chorób zakaźnych i inwazyjnych. Nieuzasadnione porównywanie ich do kleszczy wprowadza wiele uogólnień i przekłamań. Odmienność taksonomiczna, zupełnie inne etapy rozwoju wynikające z cyklu życiowego a także odmienne relacje z żywicielem stawiają wątpliwości, czy można porównywać ich znaczenie z tymi powszechnie występującymi roztoczami. Wszystkie te wątpliwości i pytania skłoniły Doktoranta do

podjęcia próby wyjaśnienia przynajmniej niektórych z nich. Dlatego wybór tematyki badawczej będącej podstawą dysertacji doktorskiej oceniam wyjątkowo wysoko zarówno z naukowego jak i aplikacyjnego punktu widzenia.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma formę jednotematycznego zbioru opublikowanych w renomowanych czasopismach oryginalnych artykułów naukowych. W ramach recenzowanej pracy jako jednotematyczny cykl, ujęto cztery oryginalne artykuły opublikowane w latach 2020-2021:

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.
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.
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.
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.

Dodatkowo jako rozszerzenie osiągnięcia naukowego dołączono dwa wzory patentowe dotyczące wykorzystania strzyżaków jako biomarkerów chorób zakaźnych i inwazyjnych jeleniowatych a także koncepcji konstrukcji pojemników do przechowywania i transportu niektórych krwiopijnych muchówek. Oba zgłoszenia są pokłosiem prowadzonych badań i świadczą o wyjątkowej kreatywności Autora.

Zebrane w cyklu publikacyjnym prace są opracowaniami wieloautorskimi w których lek. wet. Remigiusz Gałęcki jest pierwszym autorem. Na wyjątkową uwagę i docenienie zasługuje włączenie do prac zespołu uznanych autorytetów światowych z zakresu badań nad wpleszczami. Ich współautorstwo jest gwarantem wysokiej jakości prowadzonych badań. Wszystkie prace naukowe będące podstawą dysertacji doktorskiej zostały opublikowane

w renomowanych czasopismach z listy *Journal Citation Report* (JCR). Sumaryczny czynnik wpływu (IF) wynosi 11,214 a łączna liczba punktów dla czasopism z bazy MNiSW wynosi 400. Spośród załączonych prac wszystkie są pracami doświadczalnymi zawierającymi wyniki badań własnych. Spełniając wymóg jednotematyczności cyklu, wszystkie prace poświęcone są problematyce związanej z różnymi aspektami inwazji strzyżaków w wybranych lokalizacjach odzwierciedlających aktualną sytuacją inwazjologiczną oraz zagrożenia związane z występowaniem wielu patogenów zakaźnych i inwazyjnych stwierdzanych w analizowanych strzyżakach. Dobór artykułów w ramach cyklu jest wyjątkowo trafny korelując ze wszystkimi postawionymi w dysertacji doktorskiej celami. Cykl tworzy spójną całość począwszy od tematyki inwazjologicznej, następnie przechodząc do różnorodności genetycznej, kończąc na wykazaniu realnej roli tych muchówek w przenoszeniu ważnych patogenów ludzi i zwierząt. Koncepcja pracy doktorskiej cechuje się dojrzałością ogólnego spojrzenia na problem badawczy, trafnością wyboru warsztatu oraz właściwym doborem potencjalnych dowodów dokumentujących stawiane tezy. Obejmuje szerokie aspekty poznawcze jak i aplikacyjne pozwalające w praktyce zastosować wykazane dowody.
Pomysły dwu zgłoszeń patentowych dotyczące praktycznych zastosowań, które narodziły się w trakcie wykonywani badań są ciekawym i cennym uzupełnieniem osiągnięcia naukowego.

Dysertacja doktorska liczy 81 stron maszynopisu, zawiera kopie opublikowanych prac oraz kopie zgłoszeń patentowych P.439829. („Zastosowanie strzyżaków jako biologicznych markerów do wykrywania chorób przenoszonych przez wektory u jeleniowatych") oraz P.439910. („Pojemniki do przetrzymywania i transportu ektopasożytów, zwłaszcza muchówek z rodziny Hippoboscidae ze środowiska naturalnego").
Poza stroną tytułową zawiera dedykację najbliższym osobom (str. nr 2), wykaz artykułów naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz zgłoszeń patentowych (str. nr 3), podziękowania za wsparcie finansowe i merytoryczne (str. nr 4). Na dwóch kolejnych stronach przestawiono spis treści a następnie streszczenie w języku polskim (str. 7 i 8) oraz angielskim (str. 9 i 10) i wykaz skrótów (str. nr 11). Koleje strony zawierają obszerne wprowadzenie ze zredagowanymi celami badawczymi (str. 12- 24), materiał i metody (str. 24- 32) oraz wyniki (str. 32-56) i dyskusję (str. 56-63). Kolejne to rozdział zatytułowany „Aspekt wdrożeniowy" (str. 63-65), „Podsumowanie" (str. 65-66), „Wnioski" (str. 67), „Literatura" (str. 68-76), oraz „Oświadczenia współautorów artykułów na wykorzystanie publikacji naukowych w rozprawie doktorskiej".

W rozdziale „Wprowadzenie" w podrozdziale „Taksonomia" Doktorant dokonał bardzo rozbudowanej analizy taksonomicznej dwóch gatunków strzyżaków. Następnie przedstawił rozważania dotyczące etymologii nazewnictwa przytaczając zwyczajowe i pospolite nazwy wpleszczy opierając się na licznych cytatach z historycznego piśmiennictwa odnoszące się do nazw rodziny, rodzaju a także gatunków. W dalszej części tego rozdziału przedstawił dane dotyczące geograficznego zasięgu występowania dwu gatunków strzyżaków będących przedmiotem dysertacji doktorskiej. W kolejnym podrozdziale „Opis wybranych cech morfologicznych *Lipoptena spp.*" Autor skupił się na szczegółach kluczy pozwalających różnicować wybrane gatunki pasożyta oraz opisał ich cykl rozwojowy. W dalszej części przytoczył aktualne poglądy dotyczące znaczenia strzyżaków w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej. Zwrócił uwagę , iż *L. fortisetosa* jest gatunkiem inwazyjnym, zawleczonym prawdopodobnie z intronizowanym gatunkiem jelenia azjatyckiego, stąd zakres i skala jego występowania wymaga badań. Poza tym istnieją przypuszczenia o jego roli jako wektora chorób zakaźnych i inwazyjnych wobec zwierząt wolnożyjących i człowieka o czym świadczą publikowane materiały dotyczące znajdowania materiału genetycznego wielu patogenów w badanych strzyżarkach. Doktorant różnicuje jednak fakt występowania pasożytniczego, bakteryjnego lub wirusowego DNA od realnej transmisji tych patogenów. Na uznanie zasługuje spostrzeżenie, że skoro są to pasożyty stałe (o niewielkim potencjale zmiany żywiciela w okresie dojrzałości płciowej, to wspomniane wcześniej fakty mogą być traktowane jako wyznacznik epizootiologiczny populacji określonych żywicieli. Mam w tym miejscu kilka uwag głównie w aspekcie uzupełnienia informacji oraz natury redakcyjnej. Autor w wielu miejscach podnosi podobieństwo wizualne strzyżyków do kleszczy w związku z czym w mojej opinii należy zwrócić uwagę na elementy budowy morfologicznej oraz odmienność rozwoju w celu ich różnicowania. Szczególnie godnym uwagi szczegółem jest budowa aparatu gębowego strzyżaków. Autor mówi o ugryzieniach natomiast strzyżaki mają aparat gębowy kłująco-ssący. W związku z tym należy raczej mówić o ukłuciu. W analizie rozwoju nie znalazłem informacji o typie przeobrażenia zupełnego (holometabolia) typowego dla muchówek co znacząco różnicuje je z roztoczami. Również przytaczane zwroty np. str. 17 „*Lipoptena fortisetosa* została po raz pierwszy odnotowana w Europie w latach 60" uważam że wymagają korekty. W Odniesieniu do *L. fortisetosa* jako gatunku strzyżaka raczej użyłbym rodzaju męskiego.

W ostatnim podrozdziale wprowadzenia Autor przedstawił cztery główne cele badawcze swoich badań. W mojej opinii powinny one być wydzielone i przedstawione w odrębnym od

wprowadzenia rozdziale. Przedstawione rozważania ujęte we „Wprowadzeniu" ocenianej pracy stanowią gruntowne teoretyczne uzasadnienie badań będących przedmiotem dysertacji doktorskiej oraz potwierdzają szeroką znajomość tematyki dotyczącej inwazji narzępikowatych i dobre przygotowanie merytoryczne Doktoranta.

Kolejny rozdział (piąty) poświęcony jest materiałom i metodom. W odniesieniu do celu pierwszego Doktorant opisał sposób pozyskiwania strzyżaków ze środowiska, rejestrowanie danych mikroklimatu oraz zasady identyfikacji gatunków pozyskanych strzyżaków. Moje zainteresowanie budzi trasa w lesie. Z opisu doświadczenia wynika że była to za każdym razem ta sama trasa. W związku z tym zachodzi pytanie czy w trakcie badania mogło dojść do systematycznego wyczerpywania się „zasobów" opisanego biotopu. W odniesieniu do kolejnych celów Doktorant przedstawił metodykę dotyczącą analizy molekularnej pozyskiwanych owadów w północno-wschodniej Polsce jaki i innych regionach kraju a także genetyczną identyfikację możliwych patogenów wirusowych, bakteryjnych i pasożytniczych obecnych w badanych strzyżkach. Szczegółowe opisy kolejnych etapów badań świadczą o dużym doświadczeniu badacza oraz znajomości możliwości zastosowań tych nowoczesnych technik. Jedyną uwagę mam do mało wyczerpującego punktu 5.4, gdzie nie znajduję żadnych informacji dotyczących pozyskania strzyżaków od zwierząt. Autor nie informuje o okolicznościach ani terminie pozyskiwania materiału badawczego. Nie wiadomo czy było to wykonywane przyżyciowo, czy w badaniach pośmiertnych. W rozdziale 5 Autor zaprezentował także bogatą metodykę analiz statystycznych potwierdzających istotność uzyskanych wyników. Tutaj również potwierdził dobrą znajomość i dobór adekwatnych do sytuacji metod statystycznych.

Wyjątkowo interesująca jest treść rozdziału 6 poświęconego prezentacji uzyskanych wyników. W odniesieniu do celu pierwszego potwierdzono wysoką zależność między temperaturą i wilgotnością a liczebnością *L. fortisetosa* w środowisku. W nieznacznym stopniu była ona zależna od czasokresu pobierania próbek, natomiast wiatr był czynnikiem hamującym loty owadów. Nie potwierdzono zależności tego zjawiska od ciśnienia atmosferycznego. Uzyskane dane po odpowiednim zestawieniu mogą dawać podstawy do prognozowania nasilenia występowania form inwazyjnych pasożytów zdolnych do kolonizacji żywicieli. Uwagi dotyczące togo fragmentu mają charakter redakcyjny. Autor kilkakrotnie używa zwrotu dotyczącego zależności „od czasu". Określenie to może wprowadzać czytelnika w błąd sugerując przedział czasowy, dlatego proponuję zastąpić je zwrotem „ od czasokresu". Wyniki charakterystyki molekularnej strzyżaków są wyjątkowo

ciekawe potwierdzając różne pochodzenie tych samych gatunków strzyżaków występujących w różnych rejonach kraju. Są one nowatorskie w skali podobnych badań i wnoszą interesujące wnioski co do kierunków rozprzestrzeniania się tej inwazji skąd inąd związanego z naturalnymi migracjami żywicieli. Również wyjątkowo cenne informacje Autor uzyskał w aspekcie występowania potencjalnych patogenów zwierząt i człowieka w postaci materiału genetycznego tych patogenów w badanych strzyżakach pozyskiwanych ze środowiska oraz z żywicieli. Różnice w ich prewalencji w dwu wskazanych grupach badanych owadów (pozyskanych ze środowiska oraz zebranych na zwierzętach) jednoznacznie dowodzą, że tylko wybrane z nich mogą być przenoszone przez strzyżaki. Zerowa prewalencja w grupie strzyżaków pozyskiwanych ze środowiska dotycząca *Anaplasma ovis, A. phagocytophillum , Babesia spp., Borelia spp.,* oraz *Theileria* spp. wskazuje, że strzażki nie przenoszą tych patogenów. Natomiast mogą być wektorami dla *Bartonella spp., Coxiella spp., Francisiella spp. Mycoplasma czy Rickettsia spp.*. Wyniki te rozwiewają dotychczasowe przypuszczenia co do roli strzyżyków jako wektorów potwierdzając tym samym odrębność fizjologiczną strzyżaków od kleszczy będących typowymi wektorami wielu czynników chorobotwórczych. W wyniku przeprowadzonych badań Doktorant dokonał prawidłowej analizy możliwości transmisji patogenów wysuwając wartościowe spostrzeżenie, że analiza DNA patogenów strzyżyków nawet w przypadku potwierdzenia materiału genetycznego analizowanych drobnoustrojów nie jest dowodem na ich transmisję a jedynie daje informację dotyczącą stanu epizootycznego żywicieli. Jednocześnie fakt ograniczonej możliwości zmiany żywiciela w okresie życia strzyżaków pozwala odnieść wynik badania do konkretnego zwierzęcia. Stwierdzenie to stało się podstawą wniosku patentowego „Zastosowanie strzyżaków jako biologicznych markerów do wykrywania chorób przenoszonych przez wektory u jeleniowatych". Również z dużym uznaniem należy odnieść się do drugiego wniosku patentowego wzbogacającego dysertację doktorską pt. „Pojemniki do przetrzymywania i transportu ektopasożytów, zwłaszcza muchówek z rodziny Hippoboscidae ze środowiska naturalnego" będącego pokłosiem prowadzonych badań na strzyżakach. Pomysł stworzenia pojemnika ze zdeponowanym pokarmem w postaci zabezpieczonej przed krzepnięciem krwi kręgowców jest bardzo ciekawym, oryginalnym rozwiązaniem o praktycznym wykorzystaniu w podobnych badaniach. Doktorant w pełni zrealizował postawione w założeniach pracy cele. Dla lepszego zobrazowania uzyskanych wyników opracował wiele pozycji graficznych w postaci tabel i wykresów podnoszących znacznie wartość opracowania dysertacji doktorskiej.

W rozdziale „Dyskusja" uzyskane wyniki Doktorant skonfrontował z wynikami dostępnymi w bogatym i trafnie dobranym piśmiennictwie. Autor wykazał spójność swoich wyników oraz uzupełniający charakter jego badań w relacji do analiz prowadzonych przez innych autorów. Omawiana dyskusja znacząco wzbogaca wartość pracy i jest potwierdzeniem bardzo dobrego przygotowania merytorycznego. Zarówno dobór metod badawczych jak też interpretacja wyników badań własnych, w konfrontacji z licznie cytowanymi pracami innych autorów świadczą o dojrzałości naukowej Doktoranta. Analizując treść dyskusji znajduję jednak kilka sformułowań które budzą moje wątpliwości. Autor używa dosłownego tłumaczenia z języka angielskiego słowa „host" jako gospodarz. W parazytologii tłumaczy się to wyłącznie jako żywiciel. Również niezrozumiałe dla mnie jest ostatnie zdanie w rozdziale dyskusja, gdzie Autor usiłuje kategoryzować strzyżaki jako szkodniki. Termin ten jest dość ogólny i oznacza „organizmy powodujące straty w działalności rolnej, leśnej, magazynowej, także uszkadzające kolekcje, zbiory muzealne, biblioteczne itp." Proponuję pozostać przy określeniu pasożyt dla którego strzyżaki spełniają wszystkie kryteria definicji a mianowicie środowisko życia, źródło pokarmu, szkodliwe oddziaływanie i powtarzalność zjawiska. Uzyskane wyniki badań pozwoliły Doktorantowi na wysunięcie aż 15 wniosków korespondujących do wyników badań. Do niektórych odniosłem się już wcześniej (wniosek nr 1). Niektóre z nich są wyłącznie powtórzeniem szczegółowych wyników badań. W mojej opinii wnioski powinny stanowić konkluzję uzyskanych wyników badań i mieć charakter ogólny. Dlatego sugeruję ich przeformatowanie, kumulację i ograniczenie do 4 lub 5 najważniejszych w nawiązaniu do celów pracy.

W dalszej części dysertacji Doktorant zamieścił skany opublikowanych artykułów naukowych będących podstawą pracy doktorskiej. Artykuły te ukazały się w czasopismach recenzowanych dlatego ocena ta nie dotyczy tych publikacji. Natomiast moją uwagę przykuwa niespotykana w innych artykułach kolejność rozdziałów w pracy „Molecular Detection of selected pathogens with zoonotic potential in deer keds (Lipoptena fortisetosa). Pathogens, 10(3), 324. Rozdział „Materials and Methods" oznaczony kolejną cyfrą 4 został ujęty na końcu artykułu przed oznaczonym cyfrą 3 rozdziałem " Discussion" i rozdziałem nr 2 „Results".

Podsumowując, obiektywnie stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana lek. wet. Remigiusza Gałęckiego wnosi nowe, oryginalne wartości poznawcze i poszerza wiedzę na temat występowania i znaczenia wpleszczy jeleniowatych. Mimo przytoczonych uwag krytycznych głównie o charakterze redakcyjnym pracę oceniam bardzo wysoko, szczególnie

za umiejętność połączenia w niej wyników badań o charakterze wyłącznie poznawczym jak i aplikacyjnym czego dodatkowym dowodem jest zgłoszenie dwu wniosków patentowych. Nie wnoszę żadnych uwag co do aspektów merytorycznych pracy. Na szczególną uwagę zwraca jej pracochłonność wynikająca z prowadzenia badań w różnych rejonach kraju a także wyjątkowo szeroki dobór badań molekularnych obejmujących zarówno badane pasożyty jak patogeny przez nie przenoszone. Doktorant wykazał się dużą znajomością różnorodnej metodyki badań ściśle parazytologicznych jak i molekularnych które zaowocowały ciekawymi wynikami.

W mojej ocenie praca ta odpowiada w pełni warunkom określonym w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki w związku z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669).w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

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

Dodatkowo z uwagi na znaczącą wartość pracy oraz wkład jaki ona wnosi do poszerzenia wiedzy dotyczącej niszowych pasożytów zwierząt wolnożyjących oraz realnego zagrożenia zdrowia człowieka z ich strony, składam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Krzysztof Tomczuk