Praca doktorska

Doctoral dissertation

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

Lek. wet. Remigiusz Gałęcki

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

Olsztyn 2023

„Per aspera ad astra”

Niniejszą rozprawę doktorską dedykuję

Ismenie i Elżbiecie,

najważniejszym kobietom mojego życia.

Silvie, najlepszej kompance podróży.

Pracę doktorską stanowi cykl 4 artykułów oryginalnych oraz 2 zgłoszenia patentowe.

Prace oryginalne:

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.

Zgłoszenia patentowe:

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

Sumaryczna liczba punktów MNISW – 400.
Sumaryczny *Impact Factor* - 11.241.

Badania zostały wsparte finansowo przez:

- Konsorcjum Naukowego „Zdrowe zwierzę – bezpieczna żywność”, które otrzymało status Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego na lata 2015-2019 w obszarze nauk rolniczych, leśnych i weterynaryjnych w dziedzinie nauk weterynaryjnych.
- Katedrę Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.
- National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido, Japonia.

Koszty publikacji sfinansowano w ramach programu Ministra Edukacji i Nauki pod nazwą "Regionalna Inicjatywa Doskonałości" w latach 2019 – 2022, nr projektu 010/RID/2018/19, kwota finansowania 12 00 000 złotych.

Szczególne podziękowania za życzliwość,
wsparcie, cenne rady i cierpliwość pragnę złożyć:

dr. hab. Tadeuszowi Bakule, prof. UWM

prof. dr. hab. Jerzemu Jaroszewskiemu

prof. Xuenan Xuan

dr. hab. Łukaszowi Zielonce, prof. UWM

Oraz pozostałym pracownikom
Katedry Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz:

prof. dr hab. Magdalenie Gajęckiej

dr. hab. Kazimierzowi Obremskiemu, prof. UWM

dr. n. wet. Michałowi Dąbrowskiemu

dr. n. wet. Mirosławowi Baranowskiemu

dr n. wet. Ewie Jakimiuk

inż. Marzenie Barasińskiej

Spis treści

1. Streszczenie 7
2. Abstract 9
3. Wykaz skrótów 11
4. Wprowadzenie 12
4.1. Taksonomia 12
4.2. Etymologia nazewnictwa 14
4.3. Występowanie strzyżaków 17
4.4. Opis wybranych cech morfologicznych *Lipoptena* spp. 19
4.4.1. *Lipoptena* spp. 19
4.5. Cykl rozwojowy *Lipoptena* spp. i fenologia występowania 20
4.6. Znaczenie strzyżaków w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej 20
4.7. Zasadność podjętych badań 21
4.7.1. Potencjał wdrożeniowy 23
4.8. Cele badawcze 24
5. Materiały i metody 24
5.1. Badania nad fenologią występowania *Lipoptena fortisetosa* w środowisku 24
5.1.1. Pobieranie próbek 24
5.1.2. Identyfikacja gatunku 25
5.1.3. Pomiary mikroklimatu 25
5.1.4. Analiza statystyczna 25
5.1.5. Walidacja Uogólnionego Modelu Addytywnego 26
5.2. Charakterystyka molekularna próbek *Lipoptena fortisetosa* pozyskanych ze środowiska w północno-wschodniej Polsce 26
5.2.1. Pobieranie próbek 26
5.2.2. Identyfikacja gatunku 28
5.2.3. Analiza statystyczna 28
5.2.4. Izolacja DNA 28
5.2.5. Reakcja łańcuchowa polimerazy 28
5.2.6. Sekwencjonowanie 28
5.3. Charakterystyka molekularna próbek *Lipoptena cervi* pozyskanych ze środowiska w Polsce 29
5.3.1. Pobieranie próbek 29
5.3.4. Reakcja łańcuchowa polimerazy 30

5.3.5. Sekwencjonowanie 30
5.3.6. Analiza statystyczna....30
5.4. Molekularna identyfikacja wybranych patogenów o potencjale zoonotycznym u *Lipoptena fortisetosa* 30
5.4.1. Pobieranie próbek....30
5.4.2. Identyfikacja gatunku....30
5.4.3. Izolacja DNA 30
5.4.4. Wybór patogenów do analizy 30
5.4.5. Reakcja łańcuchowa polimerazy....31
6. Wyniki 32
6.1. Czynniki temporalno-mikroklimatyczne wpływają na fenologię *Lipoptena fortisetosa* w Europie Środkowej 32
6.2. Charakterystyka molekularna osobników *Lipoptena fortisetosa* pozyskanych ze środowiska w północno-wschodniej Polsce 40
6.3. Charakterystyka molekularna osobników *Lipoptena cervi* pozyskanych ze środowiska w Polsce....43
6.4. Molekularna identyfikacja wybranych patogenów o potencjale zoonotycznym u *Lipoptena fortisetosa* 48
7. Dyskusja....56
8. Aspekt wdrożeniowy....63
8.1. Zastosowanie strzyżaków jako biologicznych markerów chorób przenoszonych przez wektory u jeleniowatych 63
8.2. Pojemniki do przetrzymywania i transportu ektopasożytów, zwłaszcza muchówek z rodziny Hippoboscidae ze środowiska naturalnego....64
9. Podsumowanie 65
10. Wnioski....67
11. Literatura....68
12. Artykuły wraz z oświadczeniami współautorów 77

1. Streszczenie

Strzyżaki (syn. jelenice) należą do rodzaju *Lipoptena* Nitzsch, 1818. Owady te są potencjalnymi wektorami patogenów o znaczeniu epizoonotycznym. Szczególną uwagę należy zwrócić na *Lipoptena cervi* (Linnaeus, 1758) - rodzimy gatunek owada oraz *Lipoptena fortisetosa* (Maa, 1965) - gatunek inwazyjny rozprzestrzeniający się po Europie. Strzyżaki są ektopasożytami żywiącym się krwią. Ich żywicielami specyficznymi są jeleniowate w tym: jeleń sika, jeleń szlachetny, daniel zwyczajny, sarna europejska i łoś euroazjatycki. Opisywane ektopasożyty identyfikowano również u niespecyficznych żywicieli takich jak: koń, żubr, krowa i pies. W literaturze odnotowano również przypadki infestacji ludzi. Ugryzienia *Lipoptena* spp. mogą powodować ostre lub przewlekłe, eozynofilowe lub limfocytarne zapalenie skóry, łysienie, a nawet wstrząs anafilaktyczny. Ich rola w przenoszeniu patogenów nie została do tej pory dokładnie zbadana. W badaniach nad *L. cervi* wykazano obecność materiału genetycznego wielu patogenów w tym: *Anaplasma* spp., *Bartonella* spp., *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Theileria* spp. i *Trypanosoma* spp. Określono również warunki środowiskowe wpływające na aktywność tego gatunku w środowisku, jednak dalsze prace badawcze nad przenoszeniem patogenów i biologią tej muchówki nie były kontynuowane. Należy również zauważyć, że w odniesieniu do *L. fortisetosa* nie przeprowadzono podobnych badań. Na brak zainteresowania tym owadem wskazuje nawet brak oficjalnej polskiej nazwy.

W Polsce *L. fortisetosa* została po raz pierwszy zidentyfikowana na terenie Dolnego Śląska pod koniec lat 80. XX wieku. W latach 2007–2012 obecność tego gatunku potwierdzono w południowej i północnej Polsce. Ektopasożyt ten został zidentyfikowany na terenie Wielkopolski w 2017 roku

Celem przeprowadzonych badań była ocena korelacji między liczebnością *L. fortisetosa* poszukujących żywicieli w środowisku a wybranymi warunkami czasowo-mikroklimatycznymi w lasach na początku okresu poszukiwania żywicieli. Celem badań była również ocena występowania *L. fortisetosa* w północno-wschodniej Polsce oraz określenie związków filogenetycznych z innymi sekwencjami *L. fortisetosa* uzyskanymi w poprzednich badaniach. Kolejnym celem badań była identyfikacja materiału genetycznego patogenów o potencjale zoonotycznym u *L. fortisetosa* pozyskanych z żywicieli specyficznych i ze środowiska. Ostanim celem badań była ocena różnic genetycznych między populacjami *L. cervi* oraz określenie związków filogenetycznych z innymi sekwencjami *L. cervi* uzyskanymi w poprzednich badaniach.

Dane do badań nad fenologią *L. fortisetosa* pozyskiwano w okresie od 6 maja do 15 lipca 2019 i 2020 roku w naturalnym lesie mieszanym. W trakcie badań rejestrowano liczbę zebranych strzyżaków, datę pobrania próbki (czas w dniach), temperaturę (°C), wilgotność względną (%), ciśnienie powietrza (hPa) i prędkość wiatru (km/h). Do badań molekularnych nad próbkami *L. fortisetosa* i *L. cervi* pozyskanych z różnych regionów Polski wykorzystano gen 16S rRNA. Uzyskane wyniki poddano analizie filogenetycznej. Pozyskane w trakcie badań DNA przeanalizowano 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. przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy i sekwencjonowania.

Wyniki przedstawionych badań dostarczają dodatkowych dowodów na to, że populacje *L. fortisetosa* w Europie Środkowej mają różne linie genetyczne. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że *L. fortisetosa* utworzyła stabilne i zróżnicowane genetycznie populacje w całej Polsce. Genetyka populacji *L. fortisetosa* powinna być dalej badana w celu śledzenia migracji tych ektopasożytów na terenie Europy Północnej i Zachodniej. Potrzebne są dalsze badania, aby wykryć nowe lokalizacje i przeanalizować linie genetyczne *L. fortisetosa*. Sekwencje zidentyfikowane w tych badaniach 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 zidentyfikowano w innych krajach Europy Środkowej, a lokalne haplotypy wykryto w pojedynczych przypadkach. W analizowanych próbkach *L. fortisetosa*, pobranych od zwierząt i ze środowiska, znajdował się materiał genetyczny *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Borellia* spp., *Coxiella*-like endosymbionts, *Francisiella tularensis*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia* spp., oraz *Theileria* spp. Przyszłe badania mogą ujawnić kompetencje *L. fortisetosa* jako wektora biologicznego lub mechanicznego. Rola *L. fortisetosa* jako wektora patogenów wymaga dalszych, bardziej rozległych badań ze względu na ich nowe miejsca kolonizacji oraz loty na ludzi i zwierzęta. Są to istotne kwestie, które wymagają dalszej uwagi.

Słowa kluczowe: strzyżaki; ekofizjologia; ektopasożyty; Hippoboscidae; choroby zakaźne; narzępikowate; fenologia; filogenetyka; zmienność czasowo-klimatyczna; wektory; choroby przenoszone przez wektory

2. Abstract

Deer keds (syn. louse flies) belong to the genus *Lipoptena* Nitzsch, 1818. These insects are potential vectors of pathogens of epizoonotic importance. Particular attention should be paid to *Lipoptena cervi* (Linnaeus, 1758) - a native insect species and *Lipoptena fortisetosa* (Maa, 1965) - an invasive species spreading across Europe. Deer keds are blood-sucking ectoparasites. Their specific hosts are cervids, including: sika deer, red deer, European fallow deer, European roe deer and Eurasian elk. The aforementioned ectoparasites were also identified in non-specific hosts such as: horse, European bison, cow and dog. Cases of human infestation have also been reported in the literature. Lipoptena spp. bites can cause acute or chronic eosinophilic or lymphocytic dermatitis, alopecia and even anaphylactic shock. Their role in the transmission of pathogens has not been thoroughly investigated so far. Studies on *L. cervi* have shown the presence of genetic material of many pathogens, including: *Anaplasma* spp., *Bartonella* spp., *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Theileria* spp. and *Trypanosoma* spp. Environmental conditions affecting the activity of this species in the environment were also determined, but further research on the transmission of pathogens and the biology of this louse fly was discontinued. It should also be noted that similar studies have not been carried out for *L. fortisetosa*. Even the lack of an official Polish name indicates the minor interest in this insect.

In Poland, *L. fortisetosa* was first identified in Lower Silesia in the late 1980s. In the years 2007-2012, the presence of this species was confirmed in southern and northern Poland. This ectoparasite was identified in Greater Poland in 2017.

The aim of the study was to assess the correlation between the abundance of *L. fortisetosa* searching for hosts in the environment and selected time and microclimatic conditions in forests at the beginning of the search for hosts. The aim of the study was also to assess the occurrence of *L. fortisetosa* in north-eastern Poland and to determine phylogenetic relationships with other *L. fortisetosa* sequences obtained in previous studies. Another aim of the research was to identify the genetic material of pathogens with zoonotic potential in *L. fortisetosa* obtained from specific hosts and from the environment. The final aim of the study was to assess genetic differences between *L. cervi* populations and to determine phylogenetic relationships with other *L. cervi* sequences obtained in previous studies.

Data for research on the phenology of *L. fortisetosa* were obtained in the period from May 6 to July 15, 2019 and 2020 in a natural mixed forest. During the study, the number of deer keds collected, the date of sample collection (time in days), temperature (°C), relative humidity (%), air pressure (hPa) and wind speed (km/h) were recorded. The 16S rRNA gene was used for molecular studies on samples of *L. fortisetosa* and *L. cervi* obtained from various regions of Poland. The DNA obtained during the tests was analyzed for the presence of the following pathogens: *Anaplasma ovis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Borellia* spp., *Coxiella burnetii*, *Francisiella tularensis*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia* spp. i *Theileria* spp. using polymerase chain reaction and sequencing.

The results of the presented study provide additional evidence that the populations of *L. fortisetosa* in Central Europe have different genetic lineages. The results of previous studies indicate that *L. fortisetosa* has formed stable and genetically diverse populations throughout Poland. The population genetics of *L. fortisetosa* should be further studied in order to track the migration of these ectoparasites in northern and western Europe. More research is needed to detect new locations and analyze the genetic lineages of *L. fortisetosa*. The sequences identified in these studies indicate, that the *L. fortisetosa* population continues to spread despite geographic constraints. The presented

research reveals the genetic variability in the 16S rRNA gene of *L. fortisetosa* and *L. cervi* populations in selected voivodeships of Poland. The study regions were colonized by two dominant *L. cervi* haplotypes that were identified in other Central European countries, and local haplotypes were detected in isolated cases. The analyzed samples of *L. fortisetosa*, taken from animals and the environment, contained genetic material of *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Borellia* spp., *Coxiella*-like endosymbionts, *Francisiella tularensis*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia* spp., and *Theileria* spp. Future research may reveal the competence of *L. fortisetosa* as a biological or mechanical vector. However, the role of *L. fortisetosa* as a vector of pathogens requires further, more extensive research due to their new colonization sites and flights on humans and animals. These are important issues that require further attention.

Keywords: deer keds; ecophysiology; ectoparasites; Hippoboscidae; infectious diseases; louse flies; phenology; phylogenetics; temporal-climatic variation; vectors; vector-borne diseases

3. Wykaz skrótów

16-23S – 16S–23S ribosomal RNA gene intergenic spacer region

16S rRNA – 16S ribosomal RNA gene

18S rRNA – 18S ribosomal RNA gene

A – owady pozyskane od zwierząt

[a] – *V*-Cramera dla wszystkich próbek

AIC – Kryterium informacyjne Akaike

[b] – *V*-Cramera dla owadów pozyskanych od zwierząt

COX1 – gen oksydazy cytochromu c I

d – Średnie odległości genetyczne

df – stopnie swobody

E – owady pozyskane ze środowiska

e – błąd maksymalny

EDTA – Kwas wersenowy

F – samica

F – średnia wariancji wewnątrz grupy

f – wielkość frakcji

fla – flagellin gene

GAM coef. – współczynnik uogólnionego modelu addytywnego

GAM – Generalizowany Model Addytywny

GLM – Generalizowanych Modeli Linearnych

gltA – citrate synthase gene

GP – województwo wielkopolskie

K – kurtoza

KP – województwo kujawsko-pomorskie

L – województwo lubuskie

M – samiec

M – średnia

Max – maksimum

ME – mediana

MEGA – Molecular Evolutionary Genetics Analysis

Min – minimum

MS – średnia kwadratowa

MSP4 – Major Surface Protein 4 gene

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NP – wielkość badanej populacji

OR – iloraz szans

P – województwo pomorskie

PCR – Reakcja łańcuchowa polimerazy

r – Współczynnik korelacji *r*-Pearsona

R^2 – współczynnik determinacji.

SD – odchylenie standardowe

SE – błąd standardowy

Ske – skośność

SS – standaryzacja

TE – Tris-EDTA

TUL4 – major membrane protein gene

V – wariancja

W – współczynnik Walda

WM – województwo warmińsko-mazurskie

y – funkcja logarytmiczna

α – poziom ufności

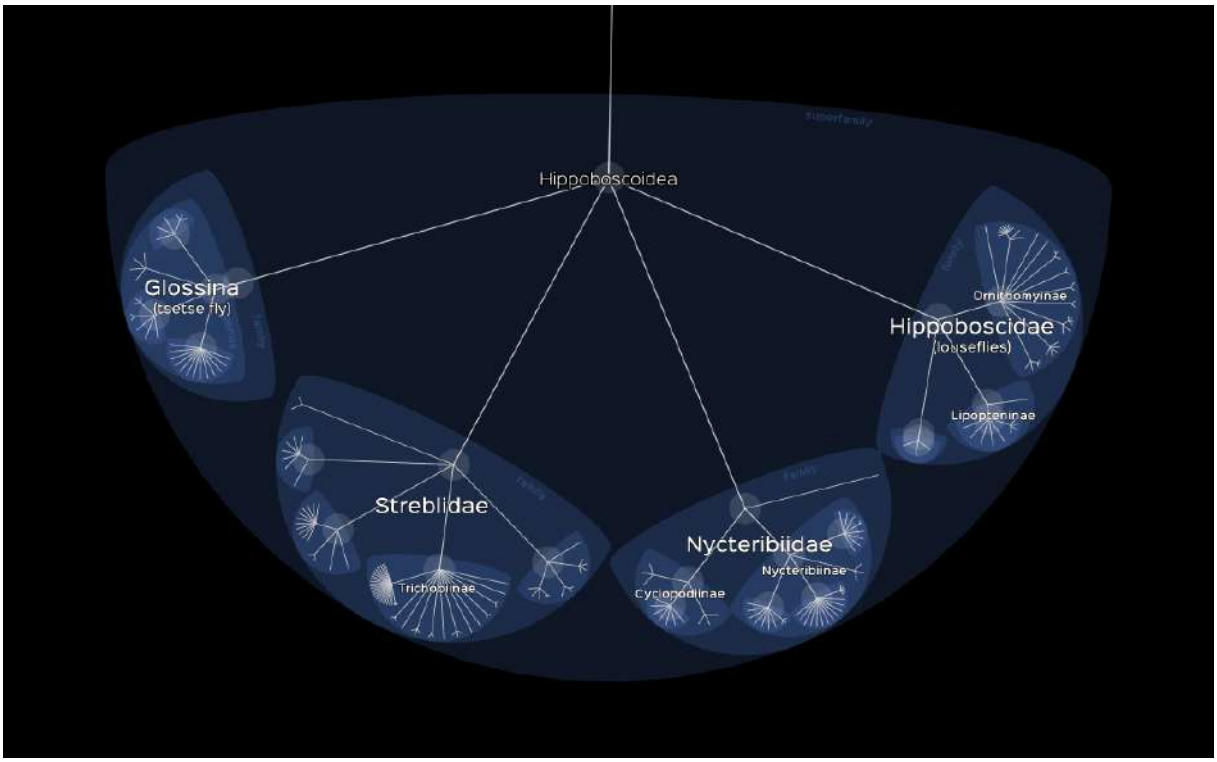
$\chi 2$ – Test zgodności chi-kwadrat

4. Wprowadzenie

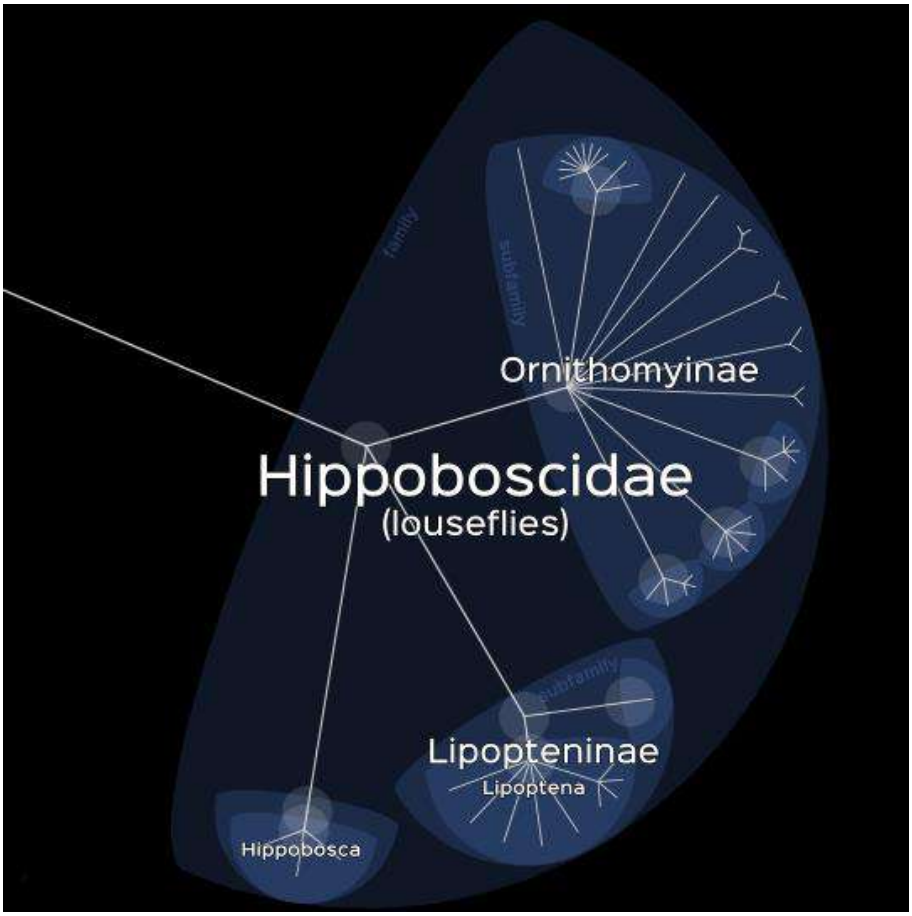
4.1. Taksonomia

Strzyżaki z rodzaju *Lipoptena* Nitzsch, 1818 są obligatoryjnymi hematofagicznymi ektopasożytami ptaków i ssaków. Należą one do nadrodziny Hippoboscoidea obejmującej 4 rodziny: Glossinidae (muchy Tsetse), Hippoboscidae (narzępikowate), Nycteribiidae (mrokawkowate) i Streblidae (Ryc. 1). Rodzinę narzępikowatych dzielimy na 3 podrodziny: Hippoboscinae, Lipopteninae i Ornithomyinae (Ryc. 2). Rodzina Hippoboscidae, obejmuje 21 rodzajów, z których 4 pasożytują na ssakach (w tym *Hippobosca* Linnaeus, 1758 i *Lipoptena* spp.), a 17 obserwowanych jest u ptaków. W skład podrodziny Lipopteninae zalicza się rodzaj *Lipoptena* spp. i *Melophagus* Latreille, 1802. Są to wysoce wyspecjalizowane muchówki spędzające całe lub większość swojego dorosłego życia na żywicielu. *Lipoptena* spp. posiada dużą liczbę unikalnych i zaawansowanych adaptacji morfologicznych i fizjologicznych, z których większość jest ściśle związana z ich ektopasożytniczym trybem życia (Petersen et al. 2007). Rodzaj *Lipoptena* spp. składa się z 32 gatunków, w tym*: Lipoptena cervi* (Linnaeus, 1758), *Lipoptena capreoli* (Rondani, 1878) i *Lipoptena fortisetosa* (Maa, 1965), które są powszechnie spotykane w Europie, Syberii, Chinach i Ameryce Północnej, a także *Lipoptena depressa* (Say, 1823), *Lipoptena mazamae* (Rondani, 1878) i *Neolipoptena ferrisi* (Bequaert, 1935), które można znaleźć w Ameryce Północnej. Szczegółową klasyfikację systematyczną strzyżaków przedstawiono w Tab. 1.

Ryc. 1. Przedstawienie nadrodziny Hippoboscoidea na mapie życia (Lifemap NCBI) (http://lifemap-ncbi.univ-lyon1.fr/)



Ryc. 2. Przedstawienie rodziny Hippoboscidae na mapie życia (Lifemap NCBI) (http://lifemap-ncbi.univ-lyon1.fr/)



Tab. 1. Klasyfikacja systematyczna strzyżaków z rodzaju *Lipoptena* spp.

Ranga kategorii systematycznej	**Nazwa kategorii systematycznej**
Królestwo	Metazoa (zwierzęta)
Podkrólestwo	Eumetazoa (tkankowce)
Infrakrólestwo	Bilateria (zwierzęta dwubocznie symetryczne)
Klad	Protostomia (pierwouste)
Nadtyp	Ecdysozoa (wylinkowce)
Klad	Panarthropoda
Typ	Arthropoda (stawonogi)
Klad	Mandibulata (żuwaczkowce)
Klad	Pancrustacea

Podtyp	Hexapoda (sześcionogi)
Gromada	Insecta (owady)
Klad	Dicondylia (sześcionogi z grupy jawnoszczękich)
Podklasa	Pterygota (owady uskrzydlone)
Infraklasa	Neoptera (nowoskrzydłe)
Kohorta	Endopterygota (skrytoskrzydłe)
Rząd	Diptera (muchówki)
Podrząd	Brachycera (muchówki krótkoczułkie)
Infrarząd	Muscomorpha
Klad	Eremoneura
Klad	Cyclorrhapha
Sekcja	Schizophora
Podsekcja	Calyptratae
Nadrodzina	Hippoboscoidea
Rodzina	Hippoboscidae (narzępikowate)
Podrodzina	Lipopteninae
Rodzaj	*Lipoptena* spp. (strzyżaki)

Opracowano na podstawie bazy taksonomicznej NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=170902&mode=info)

Wprawdzie nadrodzinie Hippoboscoidea poświęcono znaczną uwagę taksonomiczną, jednak stosunkowo niewiele wiadomo na temat relacji między wspomnianymi rodzinami (Petersen et al., 2007). Obecnie większość danych przedstawionych na ten temat w dostępnej literaturze jest trudna do ewaluacji.

4.2. Etymologia nazewnictwa

Polskie nazewnictwo jak i sama etymologia nazw gatunkowych opisywanych ektopasożytów nie jest do końca wyjaśniona. Tak samo niejasne pozostaje polskie pochodzenie nazw tych owadów. W polskiej literaturze możemy znaleźć niewiele źródeł historycznych odnoszących się bezpośrednio do rodziny Hippoboscidae jak i samych *Lipoptena* spp. W dostępnej literaturze polskie opisy tych owadów można znaleźć w „Historya obyczajów i zmyślności zwierząt, z podziałami metodycznemi i naturalnemi wszystkich ich gromad: kurs czytany w Ateneum królewskiem paryzkiem [...]. T. 2, Zwierzęta niekręgowe autorstwa Julien Joseph Virey (1844)”. Oto kilka przykładów (pisownia oryginalna):

Warszawa, nakładem S. Orgelrranda księgarza przy ulicy Miodowej Nro. 496. 1844.

- „Zakończą historyą owadów strzyżaki (Hippobosca) biegające po koniach i ptakach, i pchły. Są one takie owadami pasorzytnemi i wysysającemi; ulegają przemianom jak poprzedzające i łączą wszystkie ich cechy, wyjąwszy że te muchy mają tylko początki skrzydeł niezdatne do Iotu(1)…(1) - Strzyżakom lot służy tylko na przypadek potrzeby przeniesienia się z jednego na drugie zwierzę, bo zresztą żyją pasorzytnie i rozmnażają się na zwierzęciu. Najpospolitszy jednak, który na koniu żyje (zwykle kleszczem zwany), ma zupełne skrzydła i dobrze lata a ten który żyje na owcach, nawet i śladu skrzydeł nie ma.”. str. 30-31.
    - Komentarz: Strzyżaki są przyrównywane do pcheł i kleszczy a sam opis prawdopodobnie dotyczył *Lipoptena* spp.
- „Widujemy czasem na koniach, jaskółkach, i innych ptakach, pewne owady dwuskrzydłe, z tak krótkiemi skrzydełkami, że ledwie latać mogą, a biegają jak pająki; nazwane ztąd zostały pająkomuchami, są to narzępiki (Hippobosca) naturalistów. Te pasorzyty, z haczystemi do przyczepiania się nogami, w tem są szczególne, iż wydają, nie jaja, nie gąsienice jak muchy żyworodne, ale prawdziwą poczwarkę w zawiciu; tak, iż pierwsza przemiana robaka, odbywa się w ciele matki; jedyny pomiędzy owadami przykład.”. str. 542.
    - Komentarz: Narzępiki nazywane są inaczej „pająkomuchami”, a sam opis dotyczy muchówek z rodzaju *Hippobosca* spp. lub *Lipoptena* spp.
- „U strzyżaków (Hippobosca) są to muchy z krótkiemi skrzydłami, jak pająki, biegające po koniach), gąsienica obnaża sie ze swojego choryonu w łonie matki, która więc tym sposobem jest lątkorodną (pupipara), czyli już poczwarke niosącą. Tej przeto poczwarce, tylko jeszcze z ostatniej odziewki obnażyć sie pozostaje.”. str. 206.
    - Komentarz: opis ten dotyczy rozmnażania się muchówek z rodziny Hippoboscidae.
- „Strzyżak, Ornithomyia”. str. 709
    - Komentarz: Za strzyżaki uznawano również rodzaj *Ornithomyia* spp. Obecnie prawidłową nazwą polską dla tego rodzaju są ptasznice, a za przykład można podać *Ornithomyia avicularia* (Linnaeus, 1758) czyli Ptasznica przydymiona.
- „Hippobosca, Narzępik”. str. 720
    - Komentarz: Nazwa gatunku wykorzystywana do dziś.

Omówione dzieło zawiera liczne błędy logiczne w nomenklaturze opisywanych ektopasożytów. Wskazuje jednak na formowanie się nazewnictwa omawianych owadów w XIX wieku, która w różnych regionach kraju mogła być inna.

W środkach masowego przekazu strzyżaki są popularnie nazywane „latającymi kleszczami”. Oto kilka przykładów (pisownia oryginalna):

- „Latające kleszcze to mało znana, ale groźna odmiana owadów. Jak ochronić przed strzyżakami? Spotkanie z latającymi kleszczami nie należy do najprzyjemniejszych – mogą Cię obsiąść nawet całą chmarą, a ich ukąszenie jest bolesne. Co więcej, owady mogą przenosić bakterię *Bartonella schoenbuchensis*, która wywołuje bolesne zmiany skórne. Jak wygląda strzyżak czyli latający kleszcz?”
  Źródło: https://klodzko.naszemiasto.pl/jak-wygladaja-i-czym-sa-strzyzaki-latajace-kleszcze-sa/ar/c1-8284384
- „Latające kleszcze w polskich lasach. Jak odstraszyć strzyżaki sarnie?”
  Źródło: https://deccoria.pl/artykuly/porady-domowe/latajace-kleszcze-w-polskich-lasach-jak-odstraszyc-strzyzaki-sarnie-25-8867
- „Uważaj na latające kleszcze. Strzyżak jeleni atakuje chmarami”

Źródło: https://parenting.pl/uwazaj-na-latajace-kleszcze-strzyzak-jeleni-atakuje-chmarami

- „Latające kleszcze, czyli strzyżaki jelenie atakują w Polsce”
  Źródło: https://www.medme.pl/artykuly/latajace-kleszcze-czyli-strzyzaki-jelenie-atakuja-w-polsce,73957.html
- „Strzyżak jeleni (sarni). Latające kleszcze - objawy ukąszenia przez kleszcza ze skrzydłami”
  Źródło: https://www.poradnikzdrowie.pl/zdrowie/choroby-pasozytnicze/strzyzak-jeleni-sarni-kleszcz-ze-skrzydlami-objawy-ukaszenia-aa-dXGL-mCtg-Yth7.html
- „Latające kleszcze - czym są? Jak wygląda ugryzienie? Czy jest groźne?”
  Źródło: https://www.tokfm.pl/Tokfm/7,103085,25930818,latajace-kleszcze-czym-sa-jak-wyglada-ugryzienie-czy-jest.html

Zjawisko to może być spowodowane podobieństwem tych owadów i kleszczy w wyglądzie oraz poruszaniu się po ciele. Dodatkowo niektóre gatunki tych muchówek zrzucają skrzydła po znalezieniu żywiciela ostatecznego, co dodatkowo zwiększa ich podobieństwo do kleszczy. Omawiane zjawisko wskazuje także na niski poziom wiedzy społecznej w odniesieniu do ektopasożytów występujących na terenie Polski. Należy z całą mocą zaznaczyć, że strzyżaki nie należą do gromady pajęczaków (Arachnida) a tym samym do rzędu kleszczy (Ixodida). Do innych nieprawidłowych nazw *Lipoptena* spp. pojawiających się w mass mediach możemy zaliczyć: łowik (rodzina Asilidae), wesz jelenia (podrząd owadów wtórnie bezskrzydłych - Anoplura), strzykacz (nazwa prawidłowa dla *Cephenemyia stimulator,* Clark, 1815), muchówka krótkoczułka (jest to prawidłowa nazwa tylko dla podrzędu muchówek) itd.

Prawidłowe nazwy polskie dla rodziny Hippoboscidae to narzępikowate i wpleszczowate. Obie te nazwy można traktować synonimicznie, choć ich pochodzenie i znaczenie jest raczej zbieżne. Słowo „narzępikowate” prawdopodobniej pochodzi od słów na- i –rząp. Słowo „rząp” lub „rząpia” pochodzi z około XVI wieku i zgodnie ze słownikiem etymologicznym języka polskiego oznacza guzicę, zakończenie kręgosłupa i jego okolice, kość ogonową, kuper lub ogon (Brückner, 1926). W dosłownym tłumaczeniu nazwa narzępikowate oznacza owada siadającego na zakończeniu kręgosłupa (w okolicach kręgów ogonowych). Znaczenie tej nazwy wpisuje się chociażby w zachowania narzępika końskiego (*Hippobosca equina* Linnaeus, 1758) związane ze zdobywaniem pokarmu. Ektopasożyt ten pobiera krew od zwierząt zwykle w okolicach zadu (Romaniuk et al., 2008). Owad ten mógł być często dostrzegany przez naszych przodków, chociażby w trakcie jazdy na koniach. Słowo „wpleszczowate” możliwe, że pochodzi od słów w- i –pleść. „Pleść” lub „pleść się” pochodzi z czasów prasłowiańskich i oznacza wić się wokół czegoś lub przeplatać się z czymś, łączyć pasma, przekładając jedne przed drugie, wić się, przeplatać się, plątać się (Brückner, 1926). W wolnym tłumaczeniu więc, wpleszczowate oznaczają owady wplatające/wplątujące się w coś. Znaczenie to wpisuje się w naturalny behawior i zachowania pasożytnicze muchówek z podrodziny Lipopteninae. Dobrym przykładem jest tu wpleszcz owczy (*Melophagus ovinus* Linnaeus, 1758), którego nasi przodkowie mogli spotykać wplątanego w sierść małych przeżuwaczy. Homologiczne zachowania są obserowalne u *Lipoptena* spp. Możliwe, że nazwa strzyżak pochodzi od słowa „strzyc”. Słowo to oznacza skracać włosy, sierść; obcinać sierść zwierząt w celu pozyskania wełny (Brückner, 1926). W wolnym tłumaczeniu strzyżak oznaczać może owada strzyżącego. Próba wyjaśnienia etymologii tego słowa ma swoje odzwierciedlenie w rzeczywistości, ponieważ, zwierzęta silnie zainfestowane tracą sierść w miejscu aktywności tych owadów (Madslien et al., 2011). Biologiczne nazewnictwo zwyczajowe dla gatunku *Lipoptena cervi* to: strzyżak jeleni, strzyżak jelenica lub jelenica. Obecnie strzyżak sarni również jest wykorzystywany jako nazwa zwyczajowa pokrewnego gatunku

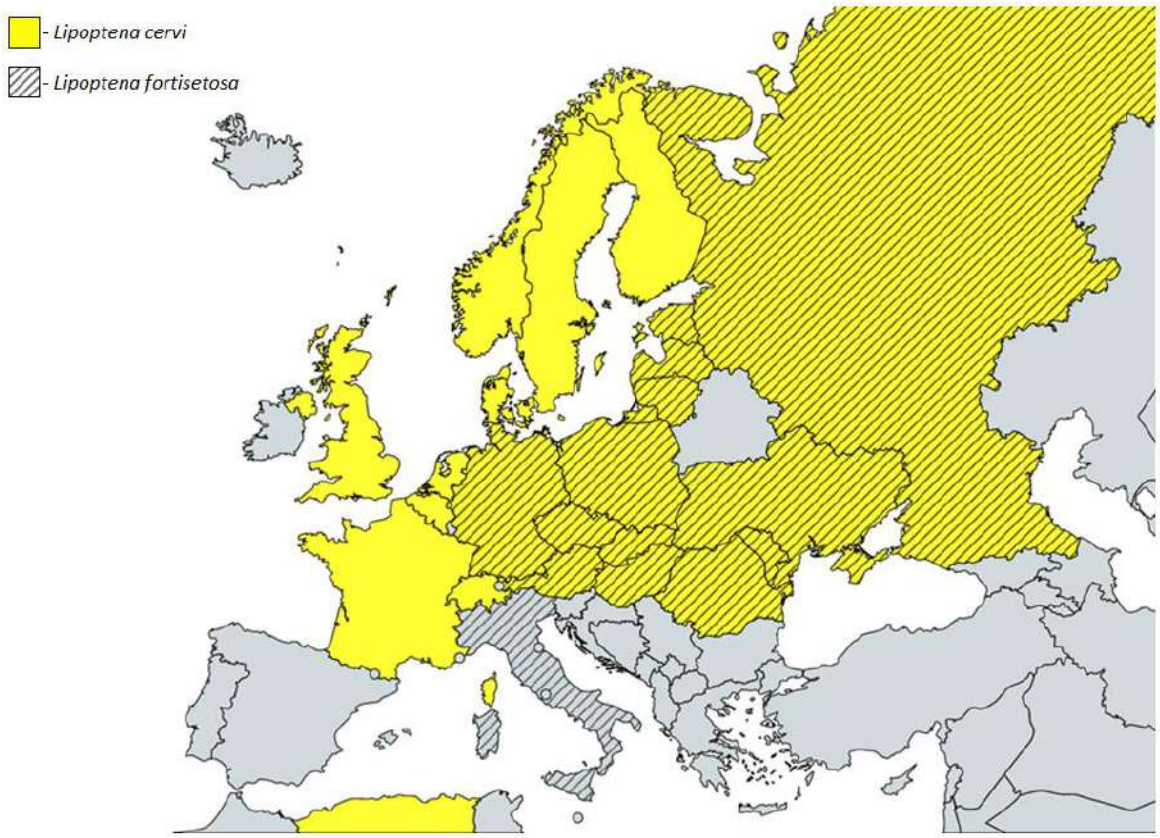
L. capreoli pochodzącego z basenu Morza Śródziemnego. *Lipoptena fortisetosa* aktualnie nie posiada swojej polskiej biologicznej nazwy zwyczajowej. W literaturze popularnonaukowej stosowano nazwy strzyżak mniejszy lub strzyżak syberyjski. Łacińską nazwę „*fortisetosa”* można interpretować jako „*fortis*” (silny), a „*setosa*” pochodzi od łacińskiego słowa „*seta*” i oznacza szczecinę (owłosienie). W wolnym tłumaczeniu nazwa „*fortisetosa”* oznacza więc silny w szczecinie. Jak do tej pory nikt nie zaproponował polskiej nazwy zwyczajowej. Nazwa „strzyżak azjatycki” podkreśliłaby charakter inwazyjny tego owada oraz zaznaczyłaby prawdopodobne pochodzenie tego gatunku w Europie.

4.3. Występowanie strzyżaków

Lipoptena cervi to rodzimy gatunek z obszaru Palearktyki. Stabilne populacje *L. cervi* zostały zidentyfikowane w kontynentalnej części Europy, Algierii, Wielkiej Brytanii, północnych Chinach oraz na wschodnim wybrzeżu Stanów Zjednoczonych (Skvarla & Machtinger, 2019). Jego obecność w Europie Środkowej i Północnej została szczegółowo opisana (Kadulski, 1996; Szczurek & Kadulski, 2004). Północna granica dystrybucji leży obecnie na około 65^{o}N długości geograficznej i stopniowo przesuwa się na północ (Hackman, 1979; Halkman, 1983).

Lipoptena fortisetosa została po raz pierwszy zidentyfikowana w 1965 roku w Japonii przez Maa (1965). Gatunek ten pochodzi ze wschodniej Palearktyki, w szczególności z Dalekiego Wschodu i wschodniej Syberii. W Europie Środkowej *L. fortisetosa* był uważany za gatunek kryptogeniczny, ale coraz częściej jest klasyfikowany jako gatunek inwazyjny (Kowal et al., 2016). *Lipoptena fortisetosa* została po raz pierwszy odnotowana w Europie w latach 60. (Theodor, 1967). Na naszym kontynencie owad ten został opisany jako nowy gatunek - *Lipoptena parvula* Theodor, 1967, jednak po przeprowadzeniu badań morfologicznych i morfometrycznych nazwy te zostały ujednolicone. Istnieją dowody sugerujące, że gatunek ten nadal rozprzestrzenia się po Europie. Obecnie owad ten został zauważony w kilku krajach europejskich, w tym w Czechach (Zeman, 1998), Estonii (Kurina et al., 2019), Włoszech (Andreani et al., 2019; Salvetti et al., 2020), Mołdawii (Metelitsa, 1989) i Słowacji (Oboňa et al., 2019). Opisywany ektopasożyt nie został wykryty w Polsce podczas programu monitorującego prewalencje ektopasożytów pośród dzikich zwierząt w latach 1973–1980 (Kadulski, 1989). W Polsce *L. fortisetosa* po raz pierwszy zaobserwowano w rejonie Dolnego Śląska pod koniec lat 80. (Borowiec & Zatwarnicki, 1989). Później, w latach 2007–2012, *L. fortisetosa* została zidentyfikowana u jeleniowatych w północnej Polsce i w Tatrach (Cydzik & Kadulski, 2009; Jędrysik & Kadulski, 2012; Kowal et al., 2009; Matysek & Kowal, 2014). W 2017 gatunek ten został wykryty na terenie Wielkopolski (Sokół & Gałęcki, 2017). Na rycinie 3 przedstawiono mapę Europy wraz z zaznaczonymi miejscami występowania *L. cervi* i *L. fortisetosa*.

Ryc. 3. Występowanie *Lipoptena cervi* i *Lipoptena fortisetosa* w Europie. Opracowanie własne na podstawie dostępnej literatury.



Lipoptena cervi i *L. fortisetosa* spotykane są przede wszystkim u żywicieli specyficznych, czyli jelenia sika (*Cervus nippon* Temminck, 1838), sarny syberyjskiej (*Capreolus pygargus* Pallas, 1771) i sarny europejskiej (*Capreolus capreolus* Linnaeus, *1758*). Pasożyt ten wykorzystuje również jelenia szlachetnego (*Cervus elaphus* Linnaeus, *1758*), daniela zwyczajnego (*Dama dama* Linnaeus, *1758*) i łosia euroazjatyckiego (*Alces alces* Linnaeus, *1758*) jako żywicieli specyficznych (Kowal et al., 2016). Obecnie na terenie Europy, z uwagi na silną dyspersję tych owadów w środowisku, niemożliwe jest określenie żywiciela dominującego.

Obserwowane obecnie zmiany klimatyczne doprowadziły do zmian w dynamice populacji zwierząt, a także pojawienia się nowych gatunków w miejscach, gdzie nigdy nie występowały (Halkman, 1983; Hansford et al., 2019; Kowal et al., 2009; Sokół & Gałęcki, 2017). Procesy te znacząco zwiększyły populację ektopasożytów w Europie. Z biegiem lat wzrosła również populacja muchówek z rodziny Hippoboscidae. Zaobserwowano nowe wzorce migracji strzyżaków, na przykład migrację *Lipoptena* spp. na Półwysep Fennoskandzki. Owady te migrują na półwysep z południowego wschodu od wczesnych lat sześćdziesiątych (Hackman, 1979; Halkman, 1983). Należy także zauważyć, że populacja dzikich zwierząt kopytnych w Polsce stale rośnie. Na szczególną uwagę zasługuje wysoki wzrost liczebności jeleniowatych (Zalewski et al., 2018). Zjawiska te wpływają również na populacje gatunków wchodzących z nimi w interakcje, zwłaszcza ektopasożytów (Madslien et al., 2012). Strzyżaki są pasożytami o wąskim zakresie żywicieli i są bezpośrednio związane z jeleniowatymi (Härkönen et al., 2010). W ostatnich latach aktywność *Lipoptena* spp. nasiliła się, zwłaszcza w lasach.

Prewalencja i intensywność infestacji *Lipoptena* spp. może być bardzo wysoka u dzikich przeżuwaczy. W Polsce te ektopasożyty wykryto u wielu gatunków jeleniowatych i innych zwierząt. Prewalencja tych ektopasożytów u poszczególnych żywicieli waha się od 64% do 78%, w zależności od gatunku (Kadulski, 1996; Szczurek & Kadulski, 2004). Strzyżaki zidentyfikowano u 64% saren europejskich (Kadulski, 1996), 76% danieli zwyczajnych i 78% jeleni europejskich (Szczurek & Kadulski, 2004). Stwierdzono również, że *Lipoptena* spp. kolonizują żubry (Izdebska, 2001). Obecność *Lipoptena* spp. stwierdzono u niespecyficznych żywicieli, takich jak zwierzęta towarzyszące (Sokół & Gałęcki, 2017), a także u zwierząt gospodarskich (Dehio et al., 2004). Dla przykładu, wykazano, że strzyżaki mogą atakować konie i bydło (Dehio et al., 2004; Metelitsa, 1989). Średnio jednego żywiciela zasiedla około 9,9 strzyżaków (Szczurek & Kadulski, 2004). Jednak w literaturze znane są przypadki, że na jednym osobniku (łosiu) bytować może nawet 16 000 strzyżaków (Vikøren et al., 2008).

4.4. Opis wybranych cech morfologicznych *Lipoptena* spp.

4.4.1. *Lipoptena* spp.

Opisy morfologiczne przygotowano na podstawie klucza do oznaczania autorstwa Borowca (1984). Strzyżaki są wysoce wyspecjalizowanymi owadami przystosowanymi do pasożytnictwa zewnętrznego. Owady te posiadają małe oczy, zajmujące co najwyżej połowę długości głowy, oraz bardzo małe przyoczka. Oczy mają kolor ciemnobrunatny z odcieniami czerwieni. Owady charakteryzują się szeroką głową umiejscowioną pomiędzy wystającymi do przodu biodrami pierwszej pary nóg. Posiadają krótkie czułki ukryte w zagłębieniach na głowie. Obecne są pojedyncze pazurki na stopach. Skrzydła obserwowane są u młodych osobników bezpośrednio po przepoczwarzeniu. Na żywicielu ostatecznym skrzydła nie są obecne. *Lipoptena* spp. posiadają zredukowaną parę skrzydeł (przezmianki) występujących na zatułowiu. Wyraźnie zaznaczone skleryty tergalne na odwłoku. Ciało jest grzbietobrzusznie spłaszczone i silnie schitynizowane. Różnice w kolorze ciała owadów są prawdopodobnie skorelowane z wiekiem (Cowan, 1943; Cowan, 1946).

4.4.1.1. *Lipoptena cervi*

Ciało owada ma długość 4,5-6,5 mm. Długość skrzydeł u tego gatunku wynosi ok. 5-6 mm. W zależności od lokalizacji na ciele, pancerz posiada kolor od jasnobrązowego po ciemnobrunatny. Szeroka głowa wraz z wyraźnie zaznaczoną płytką śródciemieniową. Płytka śródciemieniowa jest większa na szerokość. Szerokość płytki zaciemieniowej około 3 razy większa niż długość. Po bokach parafrontalii występują 2-4 długie szczecinki. Śródplecze z charakterystycznym szwem na środku ciągnącym się do tarczki. Śródplecze posiada złożoną szczecinę. Po każdej stronie szwu występuję ok. 21-27 szczecin. Przed tarczką obecne 3-4 szczeciny postalarne i tyle samo szczecin prescutellarnych. Na tarczce występuję 6-8 szczecin. Samce nie posiadają siódmego sklerytu tegralnego. U samic, przed otworem płciowym obecne są 3 skleryty pokryte szczecinkami. Dodatkowo u samic trzeci skleryt tegralny jest mniejszy od czwartego i piątego.

4.4.1.2. *Lipoptena fortisetosa*

Ciało owada ma długość 2,8-3,5 mm. Długość skrzydeł *L. fortisetosa* wynosi ok. 3 mm. Kolor pancerza taki sam jak *L. cervi*. Posiada dobrze zaznaczoną płytkę śródciemieniową na głowie. Szerokość płytki śródciemieniowej jest nieznacznie większa od długości, a płytki zaciemieniowej około 3 razy większa niż długość. Po bokach parafrontalii występują 2-3 krótkie i grube szczecinki oraz 1 długa szczecinka. Śródplecze posiada szew na środku, który nie dochodzi do tarczki. Po obu stronach szwu obserwowalny jest rząd szczecin. Dodatkowo po każdej stronie szwu występują

5-9 szczecin. Przed tarczką występują po dwie szczeciny postalarne i prescutellarne. Na tarczce obecnych jest 6 szczecin. Samce nie posiadają siódmego sklerytu tegralnego. U samic, przed otworem płciowym brak jest sklerytów. Przy otworze płciowym samic obecne są 4 szczeciny. Charakterystyczne dla samic jest też to, że trzeci skleryt tegralny jest nieznacznie mniejszy od czwartego.

4.5. Cykl rozwojowy *Lipoptena* spp. i fenologia występowania

Cykl życiowy tych ektopasożytów jest uzależniony od dostępności żywicieli jak i od warunków klimatycznych. Obecnie uważa się, że strzyżaki rozmnażają się tylko na dzikich przeżuwaczach. *Lipoptena* spp. charakteryzuje żyworodność adenotroficzna. Owady te są zdolne do lotu na krótkich dystansach (ok. 50 m). Po wylądowaniu na żywicielu owad wpełza w sierść i zrzuca skrzydła. Generalnie, ektopasożyt spędza całe swoje życie na jednym żywicielu. Zarówno samice, jak i samce strzyżaków spożywają krew swoich żywicieli. Pobieranie pokarmu trwa od 15 do 25 minut. Po pobraniu krwi zwykle dochodzi do kopulacji. Sugeruje się, że *Lipoptena cervi* jest uniwoltywna a *Lipoptena fortisetosa* multiwoltywna. Rozrodczość samicy utrzymuje się przez około 10 miesięcy. Larwa żywi się wydzielinami gruczołu mlecznego w macicy samicy (Murad & Ansari, 1980). Samica rodzi w pełni dojrzałą białą przedpoczwarkę. Narodzona przedpoczwarka natychmiast ciemnieje, tworzy poczwarkę, która utrzymuje się na sierści zwierząt lub opada na ściółkę. Zjawisko to ma miejsce jesienią i zimą. Następnie poczwarki rozwijają się do maja-września, w zależności od warunków klimatycznych. Po przepoczwarzeniu skrzydlaty dorosły osobnik wspina się na roślinność i czeka na pojawienie się żywiciela. Głównym zmysłem służącym do odnajdywaniu dogodnego żywiciela jest wzrok odbierający bodźce ruchowe oraz kolory. Strzyżaki wykorzystują także mechano- i chemoreceptory. Cykl życiowy w przypadku *L. cervi* zależy głównie od temperatury otoczenia i trwa do 30 dni w ciepłym klimacie i 270-370 dni w klimacie umiarkowanym z zimową diapauzą.

4.6. Znaczenie strzyżaków w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej

Rola wektorów w przenoszeniu chorób zakaźnych jest w ostatnich latach szeroko badana. Najbardziej przebadanymi stawonogami posiadającymi zdolności do przenoszenia patogenów są kleszcze, komary, meszki, pchły i wszy. Wiele rodzimych owadów potencjalnie zdolnych do przenoszenia patogenów, nie zostało dokładnie zbadanych w Europie (Baldacchino et al., 2014; Bueno-Marí & Jiménez-Peydró, 2011; Salvetti et al., 2020). Jednymi z najbardziej niedocenianych ektopasożytów są opisywane strzyżaki. Dotychczasowa wiedza na temat wpływu *Lipoptena* spp. na dzikie jeleniowate jest powierzchowna, a ich znaczenie medyczne i weterynaryjne jest enigmatyczne. Gatunki ważne dla weterynarii to *L. capreoli*, *L. cervi*, *L. depressa*, *L. fortisetosa*, *L. mazamae* i *N. ferrisi*. Wektory są istotną częścią koncepcji „One Health”, ponieważ są odpowiedzialne za przenoszenie patogenów między dziką zwierzyną, zwierzętami gospodarskimi, zwierzętami towarzyszącymi i ludźmi (Benelli & Duggan, 2018; Mencke, 2013). Wiele patogenów rozprzestanianych przez stawonogi, wywołuje choroby przenoszone przez wektory (z ang. *Vector-borne diseases*). Wektory mogą przenosić wirusy, bakterie, pierwotniaki i nicienie. Wirusy przenoszone przez wektory obejmują między innymi wirus Chikungunya, wirus choroby niebieskiego języka, wirus dengi, wirus krymsko-kongijskiej gorączki krwotocznej, wirus Zachodniego Nilu, hantawirus czy wirus Zika. Następujące bakterie są również przenoszone przez wektory: *Anaplasma* Theiler, 1910; *Bacillus* Cohn, 1872; *Bartonella* Strong et al, 1915; *Borellia* Swellengrebel, 1907; *Brucella* Meyer & Shaw, 1920; *Clostridium* Prazmowski 1880; *Coxiella* Philip, 1943; *Ehrlichia* Moshkovski 1945; *Erysipelothrix* Rosenbach, 1909, *Francisella* Dorofe'ev, 1947; *Leptospira* Noguchi 1917, *Listeria* Pirie, 1940; *Mycoplasma* Nowak, 1929; *Pasteurella* Trevisan, 1887; *Rickettsia* da Rocha-Lima, 1916; *Salmonella* Lignières, 1900 i *Yersinia* van Loghem 1944. Wektory odgrywają również bardzo ważną

rolę w cyklu życiowym pierwotniaków, w tym *Babesia* Starcovici, 1893; *Leishmania* Ross, 1903; *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885; *Theileria* Bettencourt et al. 1907 i *Trypanosoma* Gruby, 1843. Podobnie jak inne muchy z rodziny Hippoboscidae (Baker, 1967), *L. fortisetosa* są potencjalnymi wektorami chorób zakaźnych (Bezerra-Santos & Otranto, 2020; Regier et al., 2018). W organizmie *L. fortisetosa*, przy użyciu badań molekuralnych zidentyfikowano materiał genetyczny *Coxiella* spp., *Theileria luwenshuni* i *T. ovis* (Lee et al., 2016). *Lipoptena fortisetosa* może również służyć jako wektor dla T*rypanosoma* spp. (Böse & Petersen, 1991). Materiał genetyczny wspomnianego pierwotniaka wykryto u 20% przebadanych osobników *L. cervi* i 48,64% *L. fortisetosa* (Werszko et al., 2020). U strzyżaków wykryto także materiał genetyczny *Anaplasma* spp. i *Rickettsia* spp.(Hornok et al., 2011; Víchová et al., 2011). W pojedynczych przypadkach wykazano obecność materiału genetycznego pochodzącego od *Borrelia* spp. (Doby et al., 1994; Hulinsky & Smetana, 2002). Prewalencja *Bartonella* spp., która jest przenoszona pionowo u strzyżakow, została szeroko przebadana u *L. cervi* (De Bruin et al., 2015; Korhonen et al., 2015; Songailaitė et al., 2018; Szewczyk et al., 2017). Materiał genetyczny wspomnianego patogenu wykazywano nawet u 98% owadów (Songailaitė et al., 2018; Szewczyk et al., 2017).

U specyficznych żywicieli masowa infestacja przez *L. cervi* może prowadzić do ciężkiego łysienia (Madslien et al., 2011). Większość zwierząt zainfestowanych przez *L. cervi* rozwija zmiany skórne, w tym ostre do przewlekłego, wieloogniskowe do rozrastającego się i eozynofilowe do limfocytarnego zapalenia skóry (Madslien et al., 2011). Obecność *L. cervi* na tyrolskiej mumii Ötzi sprzed ponad 5000 lat sugeruje, że gatunek ten w przeszłości mógł pasożytować na ludziach (Gothe & Schöl, 1994). Obecnie odnotowuje się również przypadkowe infestacje u ludzi (Härkönen et al., 2009; Kortet et al., 2010). U ludzi ugryzionych przez strzyżaki może rozwinąć się zapalenie skóry, alergiczny nieżyt nosa i spojówek, a nawet wstrząs anafilaktyczny (Decastello & Farkas, 2010; Laukkanen et al., 2005; Rantanen et al., 1982). Według Härkönena i in. (2009) liczba osób, które będą wymagały leczenia z powodu zapalenia skóry wywołanego przez *Lipoptena* spp., będzie nadal rosła.

Lipoptena fortisetosa jest potencjalnym wektorem chorób zakaźnych. Mogą one przenosić *Bartonella* spp., a wertykalna transmisja tego patogenu stanowi szczególnie istotny problem (De Bruin et al., 2015; Korhonen et al., 2015; Szewczyk et al., 2017). W ostatnich badaniach, *Bartonella* spp. pochodzenia japońskiego wyizolowano z *L. cervi* na Warmii i Mazurach w Polsce (Szewczyk et al., 2017). Według Szewczyka i in. (2017), wyizolowany szczep *Bartonella* spp. pochodzi od japońskiego jelenia sika, który został wprowadzony do Europy i został przeniesiony do lokalnego środowiska przez różne wektory. Badania molekularne potwierdziły, że opisywane owady nosiły materiał genetyczny *A. phagocytophilum*, *A. ovis*, *Borrelia* spp., bakterii *Coxiella*-like, *Theileria luwenshuni*, *T. ovis* i *Trypanosoma* spp.(Böse & Petersen, 1991; Doby et al., 1994; Hornok et al., 2011; Hulinsky & Smetana, 2002; Lane et al., 2005; Lee et al., 2016; Víchová et al., 2011). Pomimo powyższego niewiele wiadomo na temat zdolności ektopasożytów do przenoszenia patogenów, innych niż *Bartonella* spp., na nowych gospodarzy.

4.7. Zasadność podjętych badań

Warunki środowiskowe odgrywają dużą rolę w liczebności *Lipoptena* spp. Należy zauważyć, że warunki pogodowe mogą również znacząco wpływać na zachowanie i fizjologię strzyżaków (Kaunisto et al., 2011). Poczwarki *L. cervi* są w stanie przetrwać zimę nawet w mroźnych rejonach północnej Europy (Härkönen et al., 2010). Badania wskazują, że te ektopasożyty wykształciły silne mechanizmy adaptacyjne do niskich temperatur. Härkonen i in. (2012) stwierdzili, że *L. cervi* może przetrwać w niekorzystnych warunkach nawet bez okresu aklimatyzacji. Opisywane ektopasożyty

wyłapane późną jesienią charakteryzowały się znacznie wyższym stosunkiem kwasów tłuszczowych nienasyconych do nasyconych, co prawdopodobnie poprawia płynność błon lipidowych i sprzyja utrzymaniu funkcji białek w niskich temperaturach (Nieminen et al., 2013). Ze względu na wyższe stężenia wolnych aminokwasów po aklimatyzacji na zimno, omawiane owady mogą być gatunkami odpornymi na zamarzanie z temperaturą przechłodzenia -7,8°C i niższą temperaturą śmiertelną -16°C (Nieminen et al., 2012). Powyższe zjawisko nie tylko przyczynia się do migracji ektopasożytów do chłodniejszych obszarów, ale może również wywoływać zmiany w ich liczebności sezonowej i zwiększać przeżywalność strzyżaków dzięki wyższej tolerancji na niską temperaturę. Jednak czynniki te nigdy nie były badane u *L. fortisetosa*. Wcześniejsze badania potwierdziły wpływ zmian temperatury i rocznych zmian klimatu na liczebność *L. cervi* (Härkönen et al., 2010; Mysterud et al., 2016). Należy zwrócić uwagę, że większość badań opierała się na danych ze stacji meteorologicznych i ośrodków meteorologicznych. Tymczasem mikroklimat określonych ekosystemów, takich jak lasy, może różnić się od danych meteorologicznych (Aussenac, 2000; Larrieu et al., 2018). Różnice w mikroklimacie mogą odgrywać istotną rolę nawet na niewielkich obszarach i lasach ze względu na ich specyficzną topografię terenu (Bohlman et al., 1995; Chen et al., 1999). Las jest naturalnym biotopem *L. fortisetosa*, ale nigdy nie zidentyfikowano czynników wpływających na liczebność opisywanych owadów w lasach. Nie ma doniesień opisujących wpływ warunków klimatycznych na początku sezonu lotów na występowanie *L. fortisetosa*. Różnice w rozkładzie płci w czasie nigdy nie były badane. Ponadto wpływ warunków klimatycznych na populację i aktywność *L. fortisetosa* nigdy nie był analizowany w Europie Środkowej.

Europejska populacja *L. fortisetosa* nadal się rozprzestrzenia i potrzebne są dalsze badania w celu oceny roli tego ektopasożyta w rozprzestrzenianiu się chorób zakaźnych. Rozszerzenie zasięgu geograficznego tego owada potwierdziły badania prowadzone we Włoszech i Estonii (Andreani et al., 2019; Kurina et al., 2019). Dotychczasowe badania opierają się w dużej mierze na pojedynczym wykazaniu materiału genetycznego danych patogenów. Większość z nich była prowadzona w małych i ograniczonych lokalizacjach. Wpływ *L. fortisetosa* na populacje zwierząt dzikich, gospodarskich, towarzyszących oraz ludzi nie został w pełni wyjaśniony. Izolacja i identyfikacja materiału genetycznego od tych ektopasożytów może dostarczyć ważnych informacji o sytuacji epizoonotycznej w krajowej populacji jeleniowatych.

Obserwowane wzorce migracji *L. fortisetosa* sugerują, że ich zasięg geograficzny powinien być monitorowany ze względu na potencjalną rolę tego ektopasożyta jako wektora chorób zakaźnych. Salvetti i in. (2020) zauważyli, że geograficzne rozmieszczenie *L. fortisetosa* w Europie powinno być analizowane pod kątem społecznych i środowiskowych implikacji, ponieważ *L. fortisetosa* może powodować problemy w gospodarce łowieckiej, w tym w zarządzaniu populacjami dzikich zwierząt. Salvetti i in. (2020) sugerują, że szczegółowa ocena linii przodków i szlaków migracji wymaga większego i częstszego pobierania próbek. Na uwagę zasługuje także fakt, że istnieje znaczna luka w rozmieszczeniu genetycznym *L. fortisetosa* między Europą Zachodnią i Wschodnią. Andreani i in. (2020; 2019) nie wykryli żadnych oczywistych i stabilnych różnic morfologicznych oraz molekularnych w okazach z Azji i Europy. We Włoszech zidentyfikowalo monofiletyczny klad *L. fortisetosa* wraz z dwoma środkowoeuropejskimi i dwoma koreańskimi haplotypami (Andreani et al., 2020).

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, pozostaje nieznana. Lokalizacje skolonizowane przez *L. fortisetosa* w północno-wschodniej Polsce nie zostały dotychczas

zbadane. Ten region Polski obfituje w lasy i charakteryzuje się coraz częstszymi lotami *Lipoptena* spp. oraz masowymi atakami na zwierzęta i ludzi. W tej lokalizacji nie badano różnic w proporcjach płci owadów poszukujących żywicieli. Może to być na tyle istotne, że u wielu samic ektopasożytów częściej identyfikuje się materiał genetyczny patogenów. Rozprzestrzenianie się *L. fortisetosa* poza Azją mogło zostać przyspieszone przez wprowadzenie na kontynent europejski jelenia sika (*Cervus nippon* Temminck, 1838), którego niewielkie, ale stabilne populacje, można znaleźć w centralnej części Śląska oraz we wschodniej części Warmii i Mazur.

Większość badań nad *L. cervi* przeprowadzono w Północnej Europie. Pasożyt ten cieszył się niewielkim zainteresowaniem badaczy z Europy Środkowej po 2000 roku. W Polsce zaprzestano badań nad *L. cervi*, a zaawansowane techniki badawcze, takie jak narzędzia biologii molekularnej, były wykorzystywane na niewielką skalę (Szewczyk et al., 2017). *Lipoptena cervi* nie jest w stanie pokonywać dużych odległości i może tworzyć izolowane populacje, gdy migracje jeleniowatych występują na małą skalę. Trout i in. (2010) zaobserwowali pewne podobieństwa między *Lipoptena* spp. i *Glossina* Wiedemann, 1830, w tym niskie wskaźniki reprodukcji i ograniczenia siedliskowe spowodowane preferencjami gospodarza, i doszli do wniosku, że populacje *Lipoptena* spp. powinny charakteryzować się wyraźną zmiennością genetyczną. W Polsce istnieje ogólny niedostatek dowodów na zmienność genetyczną w populacjach *L. cervi* w odrębnych lokalizacjach. Kurina i in. (2019) twierdzili, że dokładna identyfikacja, rozmieszczenie i bionomia *L. cervi* mają ogromne znaczenie dla zdrowia zwierząt i ludzi oraz są niezbędne dla kontroli wektorów. Badania nad *L. cervi* i *L. fortisetosa* wydają się być uzasadnione ze względu na potencjalną migrację gatunków żywicieli między krajami. Lepsze zrozumienie haplotypów *L. fortisetosa* w Europie Środkowej pomogłoby w identyfikacji potencjalnych patogenów przenoszonych między migrującymi populacjami jeleni.

4.7.1. Potencjał wdrożeniowy

Prewalencja chorób przenoszonych przez wektory w populacjach zwierzyny dzikiej może być wysoka, choć zależy ona w dużej mierze od rozmiaru populacji, gatunku zwierząt oraz lokalizacji. Wykazano obecność krętków *Borrelia burgdorferi* s.l. w 28% bioptatów skóry pobranych od jeleniowatych. *Bartonella* spp. została wykryta u 4.9% - 75.4% jeleniowatych. Dodatkowo gatunki *Bartonella* spp. u tych zwierząt mogą być silnie zróżnicowane. U jeleniowatych stwierdzono obecność *Coxiella burnetii* Derrick, 1939 u 2.2% - 5.1% osobników, a do 39% może posiadać przeciwciała skierowane przeciwko tej bakteri. Około 1% - 11.67% dzikich przeżuwaczy posiada przeciwciała na *Francisella tularensis* McCoy and Chapin, 1912. Zakażenia hemotropową *Mycoplasma* spp. u jeleniowatych może sięgać nawet 87%. Przypadki *Rickettsia* spp. u jeleniowatych odnotowywano w Słowacji i Japonii a seroprewalencja u tych zwierząt może wynosić 21.5% - 23.3%. W badaniach stwierdzono, że fluktuacje prewalencji *Anaplasma spp.* w populacji jeleniowatych wynosić mogą od 72.1% do 100% w zależności od lokalizacji. W przypadku *Babesia* spp. te fluktuacje obserwuje się na poziomie 13.9% - 100%. U jeleni europejskich stwierdzono, że *Theileria* spp. występować może u 87.8% osobników. Różnorodność oraz wysoka prewalencja patogenów spowodowana jest silną presją ektopasożytów na dzikie zwierzęta.

Pozyskanie wcześniej wspomnianych wyników zwykle wiąże się z badaniem materiału biologicznego pozyskanego od upolowanych zwierząt. Stosowanym materiałem do tego typu badań są: krew, śledziona, wątroba itp. Przy pobieraniu takich prób ważne jest ich prawidłowe pobranie, zabezpieczenie i transport w kontrolowanej temperaturze, co w warunkach terenowych często jest problematyczne. Innym aspektem jest łatwa możliwość kontaminacji próbek. Wspomniane problemy mogą wpływać na jakość uzyskanych badań w tym uzyskanie wyników fałszywie

dodatnich/ujemnych. W przypadku dzikich jeleniowatych istnieje możliwość uzyskania dodatkowego materiału biologicznego, który stanowić mogą ektopasożyty żyjące na tych zwierzętach.

Część ektopasożytów (wektorów) zmienia swoich żywicieli w trakcie cyklu rozwojowego (np. kleszcze). Inne zaś bytują zaledwie chwilę na swoim żywicielu np. komary. Powoduje to, że poszczególne ektopasożyty nie mogą być przypisane do konkretnego zwierzęcia. Aby ektopasożyt mógł zostać uznany za biologiczny marker chorób przenoszonych przez wektory musi spędzać całe swoje życie na jednym osobniku oraz wykazywać zbliżony behawior do najczęściej spotykanych wektorów w Polsce. Wspomniane założenia spełniają opisywane muchówki. Zgodnie z tymi założeniami, *L. cervi* i *L. fortisetosa* mogą być zastosowane jako biomarkery. Oba wspomniane gatunki są ektopasożytami specyficznymi dla jeleniowatych. Zajmują one identyczny biotop do tego zamieszkiwanego przez dzikie przeżuwacze i inne wektory. Dorosłe muchówki muszą znaleźć żywiciela wkrótce po przeobrażeniu, aby przeżyć i rozmnażać się. Zaraz po odnalezieniu dzikiego przeżuwacza zrzucają skrzydła i spędzają na nim całe swoje życie. Po zrzuceniu skrzydeł zaczynają pobierać krew z częstotliwością co ok. 15min.

4.8. Cele badawcze

W trakcie realizacji rozprawy doktorskiej zaplanowano następujące zadania badawcze:

- ocena korelacji między liczebnością osobników *L. fortisetosa* poszukujących żywicieli w środowisku a wybranymi warunkami czasowo-mikroklimatycznymi w lasach na początku okresu ich aktywności;
- potwierdzenie występowania *L. fortisetosa* w północno-wschodniej Polsce oraz określenie związków filogenetycznych z innymi sekwencjami *L. fortisetosa* uzyskanymi w poprzednich badaniach;
- ocena różnic genetycznych między populacjami *L. cervi* oraz określenie związków filogenetycznych z innymi sekwencjami *L. cervi* uzyskanymi w poprzednich badaniach;
- identyfikacja materiału genetycznego patogenów o potencjale zoonotycznym (*Anaplasma ovis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Borellia* spp., *Coxiella* spp., *Francisiella tularensis*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia* spp. i *Theileria* spp.) u *L. fortisetosa* pozyskanych z żywicieli specyficznych oraz środowiska.

Realizacja powyższych zadań badawczych pozwoliła na wstępną ocenę *Lipoptena* spp. jako potencjalnych wektorów chorób zakaźnych ludzi i zwierząt oraz pozwoliła na określenie ich znaczenia epizoonotycznego na terenie Polski. Przeprowadzone badania, otrzymane wyniki oraz pozyskane doświadczenie w trakcie realizacji doktoratu pozwoliły także na opracowanie pojemników do przetrzymywania i transportu ektopasożytów, zwłaszcza muchówek z rodziny Hippoboscidae ze środowiska naturalnego oraz metody stosującej strzyżaki jako biologiczne markery do wykrywania chorób przenoszonych przez wektory u jeleniowatych.

5. Materiały i metody

5.1. Badania nad fenologią występowania *Lipoptena fortisetosa* w środowisku

5.1.1. Pobieranie próbek

Muchówki pozyskiwano w okresie od 6 maja do 15 lipca 2019 i 2020 roku w naturalnym lesie mieszanym w gminie Olsztynek, woj. warmińsko-mazurskie w Polsce (53°40’31,4”N 20°20’00,4”E). Wybrano ten okres na przeprowadzenie badań, ponieważ nie pokrywał się on z sezonem rozrodczym zwierząt ani z działalnością gospodarki leśnej i charakteryzował się zauważalnym wzrostem aktywności

entomofauny. W badanym lesie dominowały drzewa iglaste, głównie sosna zwyczajna. Podszyt i runo składały się z gatunków roślin typowych dla lokalnej strefy klimatyczno-geograficznej. Podszyt pokryty był warstwą roślin zielnych i mchem. Obszar badań był siedliskiem dużej populacji jeleniowatych, w tym jelenia szlachetnego, sarny europejskiej i łosia euroazjatyckiego. Las spełniał również wszystkie cechy siedliskowe i nie charakteryzował się negatywnymi czynnikami wpływającymi na intensywność aktywności strzyżaków, opisanymi przez Madsliena i in. (2012). Dokładna trasa została wyznaczona przed eksperymentem i obejmowała dystans ok. 5,81 km na podstawie odczytów GPSMAP® 62 (Garmin, Olathe, KS, USA). Zakres wysokości wynosił od 151 do 158 m n.p.m. Trasa pobierania próbek przecinała szlaki migracji zwierząt na której znajdywano świeże ślady ich aktywności. Nie zaobserwowano działalności człowieka, która mogłaby potencjalnie wpłynąć na otrzymane wyniki. Łącznie przeprowadzono 140 obserwacji. Pomiary wykonano w godzinach od 13:00 do 17:00 (dane nie były rejestrowane poza tym przedziałem czasowym). Badacz poruszał się po ścieżce przez ok. 15 minut, a następnie zatrzymywał się na ok. 10 minut. Badacz nosił brązowe, bawełniane ubranie zakrywające całe ciało i zbierał strzyżaki natychmiast po tym, jak wylądowały na ubraniu. Podobne metody stosuje się do pobierania próbek kleszczy i innych ektopasożytów ze środowiska (Ginsberg & Ewing, 1989; Mysterud et al., 2016). Pozyskane ektopasożyty umieszczano w oddzielnych probówkach.

5.1.2.Identyfikacja gatunku

Próbki muchówek zostały przewiezione do Laboratorium Analiz Zagrożeń Biologicznych na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Gatunki i płeć strzyżaków zostały zidentyfikowane na podstawie ich cech morfologicznych i morfometrycznych pod mikroskopem stereoskopowym Leica M165C i Leica Application Suite 4.4 (Leica, Wetzlar, Germany). W oparciu o klucze taksonomiczne dla *Lipoptena* spp. opracowane przez Borowca (1984) i Maa (1969) oraz opisy morfologiczne dostarczone przez Andreani i in. (2019), strzyżaki zostały zidentyfikowane do poziomu gatunku na podstawie wymiarów ciała, ożyłkowania skrzydeł, długości i budowy gałki ocznej oraz liczby wyprostowanych włosów na mezonatum. Próbki zawierające gatunki inne niż *L. fortisetosa* zostały wyeliminowane z dalszej analizy.

5.1.3.Pomiary mikroklimatu

W trakcie badań rejestrowano liczbę zebranych strzyżaków, datę pobrania próbki (czas w dniach), temperaturę (ºC), wilgotność względną (%), ciśnienie powietrza (hPa) i prędkość wiatru (km/h). Pomiary wykonywano przed każdą sesją pobierania próbek, co godzinę w trakcie próby polowej oraz po jej zakończeniu. Podczas każdej sesji pobierania próbek wykonano łącznie pięć pomiarów. Wybrane parametry mikroklimatu mierzono: miernikiem wielofunkcyjnym ST-8820 (Cem, Shenzhen, Chiny) (temperatura, wilgotność względna), manometrem Testo 511 (Testo SE and Co. KGaA, Lenzkirch, Niemcy) (ciśnienie powietrza) oraz anemometrem Kestrel 2000 (Kestrel Instruments, Boothwyn, PA, USA) (prędkość wiatru). Urządzenia zostały skalibrowane przez producentów przed przeprowadzeniem pomiarów. Wszystkie pomiary zostały wykonane na wysokości ramion przez tego samego badacza.

5.1.4.Analiza statystyczna

Założenie liniowości i normalności zostało sprawdzone przed analizą statystyczną. W celu zbadania liniowości wygenerowano dwuwymiarowe wykresy punktowe analizowanych zmiennych. Założenie normalności walidowano za pomocą histogramów i wykresów normalności dla pozostałości. Anomalie statystyczne zostały wykluczone za pomocą algorytmu „k-najbliższych sąsiadów”.

Statystycznie istotne różnice między rozmieszczeniem płci *L. fortisetosa* a czasem określono za pomocą Generalizowanych Modeli Linearnych (GLM). Modele korelacji liniowej (współczynnik korelacji *r*-Pearsona) zostały opracowane w celu zilustrowania korelacji między warunkami czasowo-mikroklimatycznymi a liczbą zebranych osobników *L. fortisetosa*. Obliczone wartości *r* zinterpretowano następująco: < 0,2 – brak korelacji, 0,2–0,4 – korelacja słaba, 0,4–0,6 – korelacja umiarkowana, 0,6–0,8 – korelacja silna, 0,8–0,9 – korelacja bardzo silna oraz 0,9–1,0– prawie idealna korelacja. Wpływ warunków czasowo-mikroklimatycznych na liczbę zebranych ektopasożytów oceniono za pomocą Uogólnionego Modelu Addytywnego (GAM). Model został zbudowany w celu maksymalizacji jakości predykcji zmiennej zależnej (liczebność *L. fortisetosa*) na podstawie analizowanych zmiennych towarzyszących (czas, temperatura, wilgotność względna, ciśnienie powietrza i prędkość wiatru). Dla zebranych liczby muchówek z poszczególnych dni obliczono następujące wartości statystyczne: średnia (*M*), mediana (*ME*), odchylenie standardowe (*SD*), błąd standardowy (*SE*), wariancja (*V*), minimum (*Min*), maksimum (*Max*), kurtoza (*K*) i skośność (*Ske*). Różnice uznano za statystycznie istotne przy wartości $p < 0,05$. Dane zostały przetworzone w programie Statistica 13.3 (TIBCO Software, Palo Alto, CA, USA).

5.1.5. Walidacja Uogólnionego Modelu Addytywnego

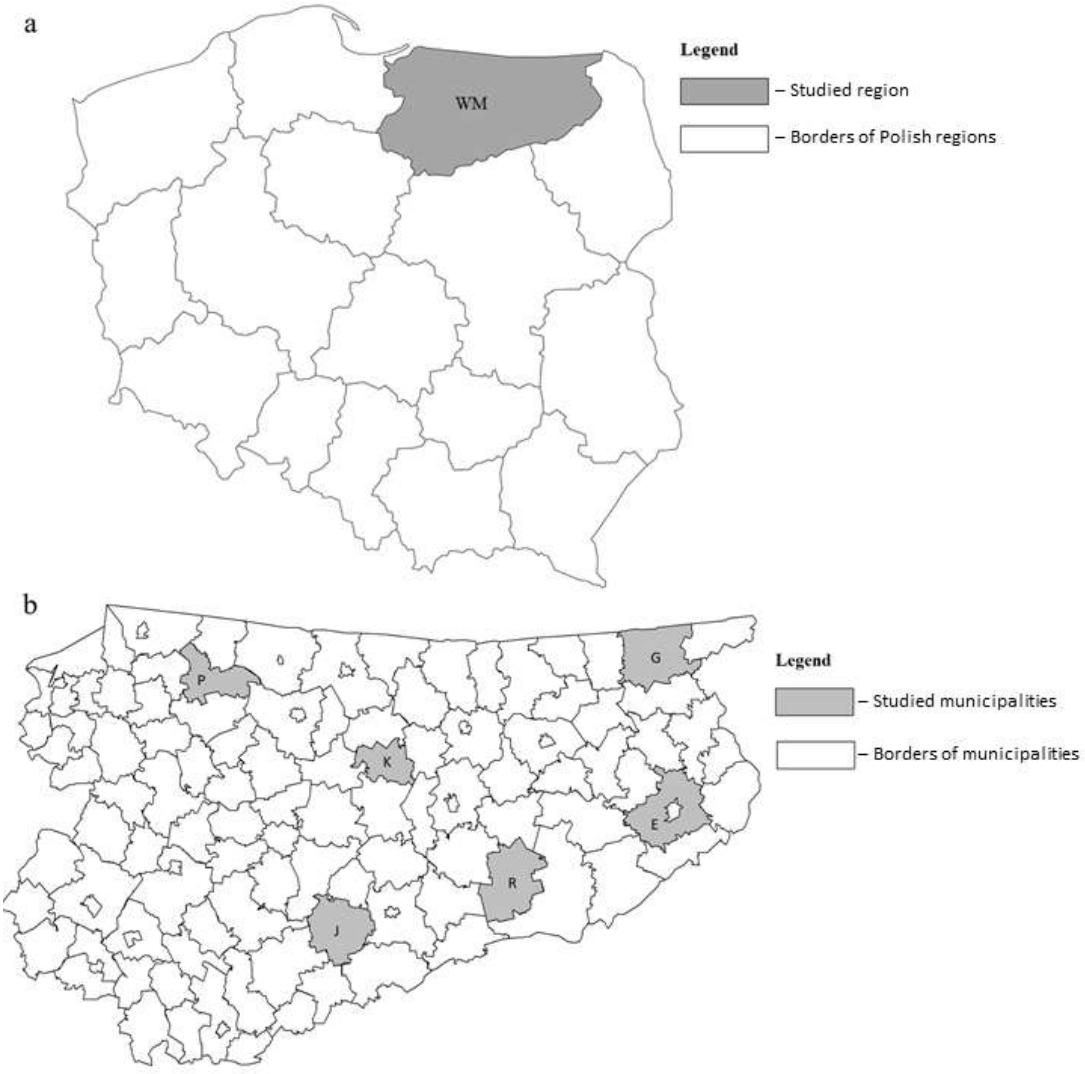
Opracowany GAM został oceniony (bez współzmiennej czasowej) w czterech różnych lokalizacjach (I—53º39’34,2”N 20º30’46,0”E; II—52º09’59,9”N 18º18’55,9”E; III—52º11’27,6”N 17º51’53,0”E; IV—53º28’24,8”N 20º34’04,9”E). W każdej lokalizacji wykonano trzy obserwacje zgodnie z opisanymi powyżej protokołami pobierania próbek i pomiarów.

5.2. Charakterystyka molekularna próbek *Lipoptena fortisetosa* pozyskanych ze środowiska w północno-wschodniej Polsce

5.2.1. Pobieranie próbek

Występowanie *Lipoptena* spp. monitorowano w naturalnych lasach mieszanych na terenie Warmii i Mazur w północno-wschodniej Polsce. Ektopasożyty monitorowano w następujących gminach: Ełk (54°19′10,1″N 22°22′38,7″E), Gołdap (54°19′10,1″N 22°22′38,7″E), Kolno (53°57′34,3″N 21°04′46.0″E), Jedwabno (53°28′24,8″N 20°34′04.9″E), Pieniężno (54°15′52,1″N 20°11′14,2″E) i Ruciane-Nida (53°35′47,4″N 21°33′13,3″E). Szczegółową mapę badanego regionu przedstawia Ryc. 4.

Ryc. 4. (a) Mapa Polski i regionu Warmii i Mazur (b) ze wskazaniem gmin, w których przeprowadzono badania terenowe. Legenda: WM = region Warmii i Mazur; E = Ełk; G = Gołdap; J = Jedwabno; K = Kolno; P = Pieniężno; R = Ruciane-Nida



Wybrane miejsca do przeprowadzenia badań charakteryzują się rozległymi kompleksami leśnymi i dużymi populacjami jeleniowatych, w tym jelenia szlachetnego, sarny europejskiej i łosia euroazjatyckiego. Badanie przeprowadzono w okresie od czerwca do lipca 2019 r. w godzinach od 7.00 do 10.00. Wybrano ten okres ze względu na zauważalny wzrost aktywności strzyżaków. Liczbę osobników *Lipoptena* spp. wyrażono jako dzienną sumę liczby skrzydlatych muchówek, schwytanych na ubraniu badacza. W każdym miejscu pobierania próbek przeprowadzono pięć pomiarów. Łącznie przeprowadzono 30 pomiarów. Badacz szedł przez las ubrany w brązowe, bawełniane ubranie zakrywające całe ciało. *Lipoptena* spp. były chwytane natychmiast po wylądowaniu na ubraniu. Podczas spaceru, badacz co 20 m sprawdzał odzież ochronną i zbierał owady. Strzyżaki, które uciekły, nie były liczone. Zebrane ektopasożyty umieszczono w pojedynczych probówkach zawierających 70% etanol.

5.2.2. Identyfikacja gatunku

Identyfikacji gatunku dokonywano zgodnie z opisem zaprezentowanym w pkt 2.1.2

5.2.3. Analiza statystyczna

Statystycznie istotne różnice w rozkładzie płci *L. cervi* i *L. fortisetosa* przeanalizowano testem t-Studenta dla prób niezależnych. Dla analizowanych populacji *L. cervi* i *L. fortisetosa* obliczono następujące parametry statystyczne na podstawie ogólnych danych z obserwacji dziennych (n = 30): średnia (*M*), mediana (*ME*), odchylenie standardowe (*SD*), błąd standardowy (*SE*), wariancja (*V*), minimum (*Min*) i maksimum (*Max*). Różnice uznano za istotne statystycznie przy wartości $p < 0,05$. Dane zostały przetworzone statystycznie w Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

5.2.4. Izolacja DNA

Z każdej lokalizacji wybrano losowo pięć próbek *L. fortisetosa* (n = 30) do analiz molekularnych. Reprezentatywną liczbę próbek oszacowano za pomocą wzorów na obliczenie minimalnej liczebności próby gwarantującej wiarygodność wyników (wielkość próby: *NP* = liczba pobranych próbek, α = 95%, f = 0,5, e = 15%). Pozyskany materiał biologiczny suszono w temperaturze pokojowej przez 15 minut i zmiażdżono sterylną pałeczką w sterylnych probówkach Eppendorfa. Z każdej próbki wyekstrahowano genomowe DNA za pomocą zestawu Sherlock AX (A&A Biotechnology, Polska) zgodnie z instrukcjami producenta. DNA eluowano w 40 µl buforu Tris-EDTA (TE), a stężenie ekstraktu sprawdzano w spektrofotometrze Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Wyekstrahowane DNA przechowywano w -20ºC, aż do użycia.

5.2.5. Reakcja łańcuchowa polimerazy

Z pozyskanego materiału biologicznego *L. fortisetosa* amplifikowano sekwencję genu rRNA 16S mitochondrialnego DNA o szacowanej długości 412 bp metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Starterami amplifikacji były L700F (5’-AAAGTTTAACCTGCCCACTGAT-3’) i L1213R (5’-CTGAACTCAGATCACGTAAGAAT-3’) (Szewczyk et al., 2017). Zastosowano następujące warunki reakcji: początkowa denaturacja w 92ºC przez 3 min; 35 cykli denaturacji w 95ºC przez 10 s; przyłączanie starterów w 60ºC przez 10 s; elongacja w 68ºC przez 30 s; elongacja końcowa w 68ºC przez 5 min (Szewczyk et al., 2017). Reakcje przeprowadzono w Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Każdą reakcję przeprowadzono w objętości 25 µl zawierającej 2,5 µl 10x Standard Taq Reaction Buffer (Biolabs, NC, USA), 0,5 µl 10 mM trifosforanu deoksyrybonukleotydów (dNTPs) (Biolabs, USA), 0,5 µl 10 µM każdego startera, 1 µl DNA *Lipoptena* spp., 0,125 µL Taq DNA Polymerase (Biolabs, NC, USA) i 19,875 µL wody podwójnie destylowanej. Kontrolą ujemną była woda podwójnie destylowana. Kontrolą pozytywną było DNA *Lipoptena cervi* pozyskane podczas poprzednich badań. Produkty PCR poddano elektroforezie na 2% żelu agarozowym. Wybarwiono je bromkiem etydyny i uwidoczniono w transiluminatorze UV.

5.2.6. Sekwencjonowanie

Próbki DNA po PCR oczyszczono metodą precypitacji etanolem opisaną przez Weinbergera (2000). DNA zsekwencjonowano z użyciem opisanych starterów (L700F/L1213R) oraz zestawu BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), a wyniki analizowano w analizatorze genetycznym ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA). Uzyskane sekwencje nukleotydowe edytowano w programie BioEdit (Hall, 1999). Następnie wyniki porównano z sekwencjami GenBank w programie BLAST NCBI (załączone w sekcji wyników). Sekwencje dopasowano algorytmem ClustalW. Analizę filogenetyczną sekwencji 16S rRNA

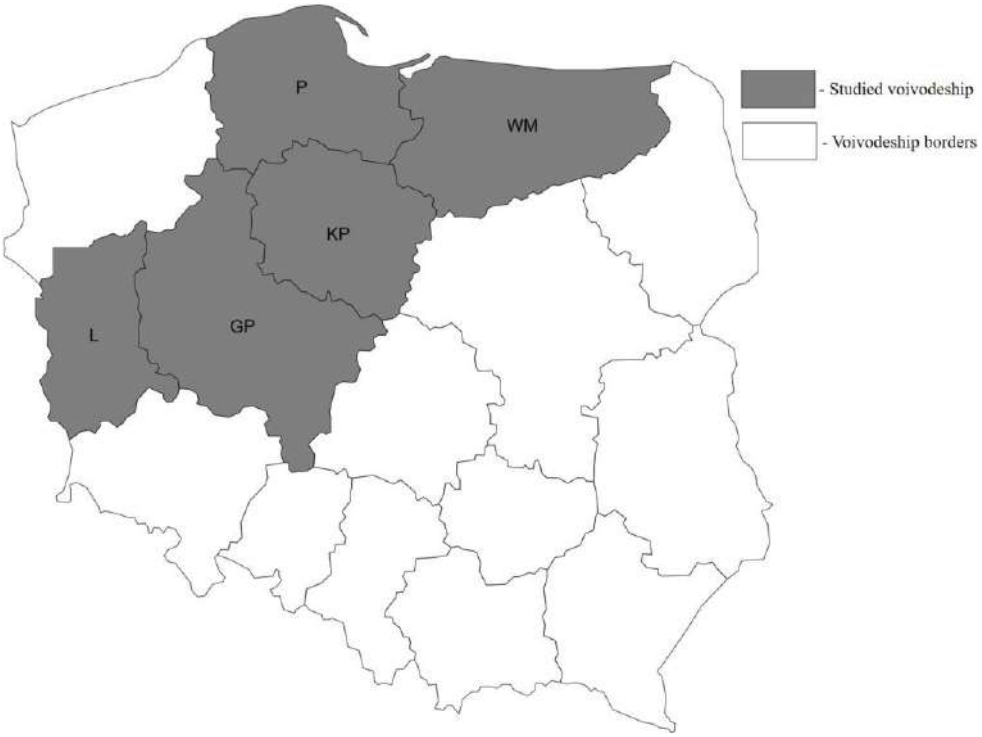
i odpowiadających im sekwencji GenBank przeprowadzono metodą największej wiarygodności i modelu Tamura–Nei w MEGA 10.1.17 (Kumar et al., 2018). Sekwencje *L. cervi* służyły jako grupa zewnętrzna. Wybór modelu oparto na kryterium informacyjnym Akaike (AIC). Wartości ufności Bootstrap do oceny wiarygodności gałęzi obliczono dla 10 000 powtórzeń.

5.3. Charakterystyka molekularna próbek *Lipoptena cervi* pozyskanych ze środowiska w Polsce

5.3.1. Pobieranie próbek

Muchówki pozyskiwano lasach mieszanych w Polsce. Badania przeprowadzono w pięciu województwach: wielkopolskim, kujawsko-pomorskim, lubuskim, pomorskim i warmińsko-mazurskim. Szczegółową mapę badanych regionów przedstawiono na Ryc. 5. Dorosłe *L. cervi* pobrano z losowo wybranych kompleksów leśnych w każdym województwie. Fauna i flora składały się z gatunków typowych dla polskiej strefy klimatyczno-geograficznej. W każdym miejscu znaleziono świeże ślady jeleniowatych, w tym jelenia szlachetnego i sarny europejskiej. Strzyżaki pozyskiwano zgodnie z metodologią opisaną w pkt 4.2.1. Owady umieszczono w oddzielnych probówkach wypełnionych 70% etanolem. Z każdego województwa pobrano po siedem próbek *L. cervi* do dalszych analiz.

Ryc. 5. Mapa Polski z zaznaczonymi województwami, w których pobrano próbki *Lipoptena cervi*.



Legenda: GP - województwo wielkopolskie; KP - województwo kujawsko-pomorskie; L - województwo lubuskie; P - województwo pomorskie; WM - województwo warmińsko-mazurskie.

5.3.2. Identyfikacja gatunku

Identyfikacji gatunku dokonywano zgodnie z opisem zaprezentowanym w pkt 4.1.2.

5.3.3. Izolacja DNA

Do analiz molekularnych wykorzystano 7 losowo wybranych próbek *L. cervi* z każdego województwa (n = 35). Izolację DNA przeprowadzono zgodnie z opisem w pkt. 4.2.4.

5.3.4. Reakcja łańcuchowa polimerazy

Procedurę wykonano zgodnie z pkt. 4.2.5.

5.3.5. Sekwencjonowanie

Procedurę wykonano zgodnie z pkt. 4.2.6.

5.3.6. Analiza statystyczna

Statystyki opisowe, w tym: średnią (*M*), odchylenie standardowe (*SD*) i wariancję (*V*) obliczono w programie Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, USA). Wewnątrzgatunkowe odległości genetyczne (*d*), średnie zróżnicowanie międzypopulacyjne (*d*), średnie odległości genetyczne (*d*), błąd standardowy (*SE*), średni dystans ewolucyjny i częstości nukleotydów obliczono w MEGA 10.1.17 (Kumar et al., 2018).

5.4. Molekularna identyfikacja wybranych patogenów o potencjale zoonotycznym u *Lipoptena fortisetosa*

5.4.1. Pobieranie próbek

Strzyżaki pobrano w pięciu województwach opisanych w pkt 4.3.1. Szczegółową mapę badanych regionów przedstawiono na rycinie 5. Pozyskane owady *L. fortisetosa* podzielono na dwie grupy: Zwierzęta (A) – owady pobrane od jeleniowatych oraz Środowisko (E) – owady ze środowiska poszukujące żywiciela. Do badania pobrano łącznie 500 osobników *L. fortisetosa*. Grupa A składała się z 250 strzyżaków. Owady zbierano z ciał martwych lub żywych jeleniowatych. Do analizy losowo wybrano jednego ektopasożyta z każdego zwierzęcia. Pozyskano po 50 próbek z każdego badanego województwa. Grupa E składała się z 250 strzyżaków. Owady zebrano w losowo wybranych środkowoeuropejskich lasach mieszanych. Z każdego miejsca pozyskano do 5 osobników *L. fortisetosa*. Owady pozyskano zgodnie z procedurą opisaną w pkt 2.2.1. Z każdego badanego województwa uzyskano po 50 owadów. Ektopasożyty z grup A i E zanurzono w 70% etanolu w oddzielnych probówkach.

5.4.2. Identyfikacja gatunku

Identyfikacji gatunku dokonywano zgodnie z opisem zaprezentowanym w pkt 4.1.2

5.4.3. Izolacja DNA

Izolację DNA przeprowadzono zgodnie z opisem w pkt. 4.2.4

5.4.4. Wybór patogenów do analizy

Na podstawie przeglądu literatury (Aguirre et al., 1995; Astobiza et al., 2011; Bourque & Higgins, 1984; Bruno et al., 2000; Dehio et al., 2001; Elfving et al., 2015; Grazziotin, Duarte, et al., 2011; Grazziotin, Santos, et al., 2011; Inokuma et al., 2008; Kauffmann et al., 2017; Oaaland et al., 1977; Sacristán et al., 2021; Sawczuk et al., 2008; Stefanidesova et al., 2008), wyselekcjonowano następujące patogeny: *Anaplasma ovis* Lestoquard, 1924; *A. phagocytophilum* Foggie, 1949; *Babesia* spp.; *Bartonella* spp.; *Borellia* spp.; *Coxiella burnetii*; *Francisiella tularensis*; *Mycoplasma* spp.; *Rickettsia* spp. i *Theileria* spp.

5.4.5.Reakcja łańcuchowa polimerazy

Sekwencje starterów i warunki PCR przedstawiono w Tab. 2. Każdą reakcję przeprowadzono w końcowej objętości 25 µl, zawierającej 2,5 µl 10 Standard Taq Reaction Buffer (Biolabs, Boston, MA, USA, USA), 0,5 µl 10 mM dNTPs (Biolabs, USA), 0,5 l 10 M roztworu każdego startera, 1 µl izolowanego DNA, 0,125 µl polimerazy Taq DNA (Biolabs, USA) i 19,875 µl podwójnie destylowanej wody. Reakcję przeprowadzono w Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). W próbce ujemnej DNA zastąpiono wodą podwójnie destylowaną. Próbka dodatnia składała się z próbek referencyjnych DNA każdego analizowanego patogenu udostępnionych przez National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine. Produkty PCR poddano elektroforezie w 1,5–2,5% żelu agarozowym, wraz drabinką DNA 100 bp, jako marker wielkości masy cząsteczkowej i wybarwiono bromkiem etydyny a następnie oglądano pod transiluminatorem UV. Do sekwencjonowania kierowano dwie próbki dla każdego patogenu o najsilniejszej ekspresji prążka. Wszystkie produkty PCR, które były pozytywne na *Francisella* spp. zostały zweryfikowane za pomocą sekwencjonowania.

Tab.2. Startery i zastosowane warunki prowadzonych PCR.

Gatunek	Docelowy gen	Nazwa startera	Sekwencja startera (5' - 3')	Oczekiwana wielkość (bp)	Warunki cyklu PCR	Literatura
Anaplasma ovis	MSP4	MSP43R MSP45F	CCG GAT CCT TAG CTG AAC AGG AAT CTT GC GGG AGC TCC TAT GAA TTA CAG AGA ATT GTT TAC	347	94°C/5 min; 40 cykli: 94°C/30 s, 60°C/30 s, 72°C/1 min; 72°C/7 min	Ochirkhuu et al. (2017)
Anaplasma phagocytophilum	MSP4	Aphamsp4F Aphamsp4R	ATGAATTACAGAGAATTG CTTGTAGG TTAATTGAAAGCAAATCT TGCTCCTATG	849	94°C/5 min; 40 cykli: 94°C/10 s, 58°C/10 s, 72°C/50 s; 72°C/5 min	Bown et al. (2007)
Bovine* *Babesia* spp.	18S rRNA	BabsppF1 BabsppR	GTTTCTGMCCCATCAGCTT GAC CAAGACAAAAGTCTGCTT GAAAC	440	45 cykli: 94°C/30 s, 61°C/30 s, 72°C/45 s; 72°C/10 min	Hilpertshause ret al. (2006)
Bartonella spp.	16-23S gene	Bartonella spp. F Bartonella spp. R	CTTCGTTTCTCTTTCTTCA AACCAACTGAGCTACAAG CC	154-260	95°C/2min; 45 cykli: 95°C/1 min, 60°C/1 min, 72°C/30 s; 72°C/5 min	Jensen et al. (2000)
Borrelia spp.	fla	Borrelia spp. flaF Borrelia spp. flaR	ACATATTCAGATGCAGAC AGAGGT AACAGCTGAAGAGCTTGG AATG	350	95°C/5 min; 40 cykli: 95°C/1 min, 55°C/1 min, 72°C/30 s; 72°C/5 min	Barbour et al. (1996)
Coxiella burnetii	16S rRNA	Coxiella 16SrRNA F Coxiella 16SrRNA R	ATTGAAGAGTTTGATTCTG G CGGCTTCCCGAAGGTTAG	1457	95°C/3 m; (2 cykli: 95°C/30 s, 58°C/30 s, 72°C/2 min; 10 cykli: 95°C/30 s, 58-50°C/30 s, 72°C/2 min; 30 cykli: 95°C/30 s, 48°C/30 s, 72°C/2 min); 72°C/5 min	Zheng et al. (2017)
Francisella tularensis	TUL4	Ff393 Ff642	ATGGCGAGTGATACTGCT TG GCATCATCAGAGCCACCT AA	248	98°C/30 s; 35 cykli: 98°C/10 s, 53.4°C/ 30 s, 72°C/1 min; 72°C/10 min.	Long et al. (1993)
Mycoplasma spp.	16S rRNA	HBT-F HBT-R	ATA CGG CCC ATA TTC CTA CG TGC TCC ACC ACT TGT TCA	595	94°C/10 min; 40 cykli: 95°C/30 s, 60°C/30 s, 72°C/30 s; 72°C/10 min	Liu et al. (2016)

Rickettsia spp.	gltA	Rickettsia gltA F	GCAAGTATCGGTGAGGAT GTAAT	401	95°C/3 min; 40 cykli: 95°C/15 s, 48°C/30 s, 72°C/30 s; 72°C/7 min	Labruna et al. (2004)
		Rickettsia gltA R	GCTTCCTTAAAATTCAATA AATCAGGAT			
Theileria spp.	18S rRNA	989	AGT TTC TGA CCT ATC AG	1098	94°C/5 min; 35 cykli: 94°C/30 s, 53°C/30 s, 72°C/1 min; 72°C/7 min	Li et al. (2014)
		990	TTG CCT TAA ACT TCC TTG			

Legenda: *- *B. divergens, B. bigemina, B. major.*

5.4.6. Sekwencjonowanie

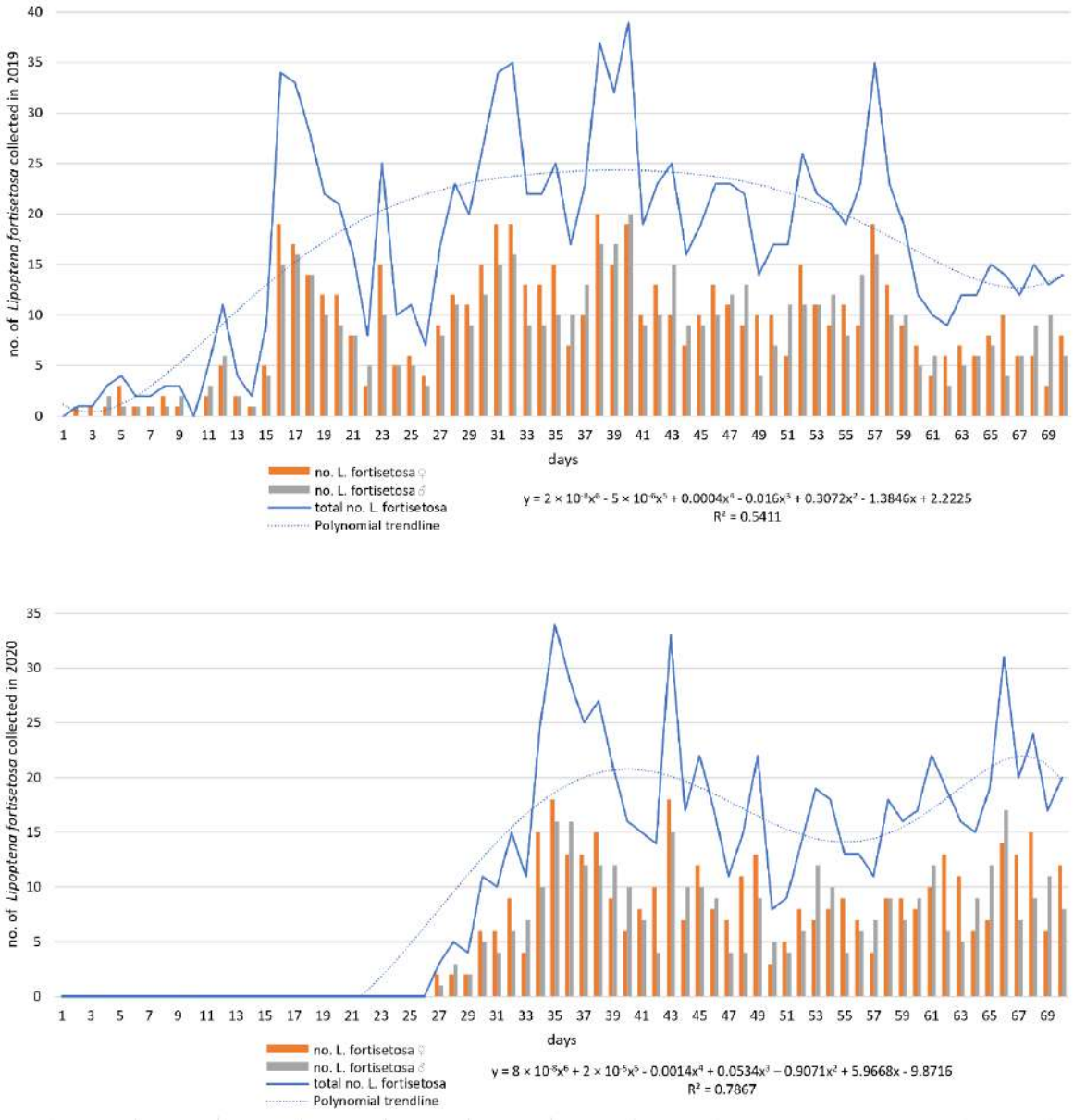
Próbki DNA po PCR oczyszczono metodą precypitacji etanolem DNA zsekwencjonowano z użyciem opisanych starterów opisanych w Tab. 2 oraz zestawu BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), a wyniki analizowano w analizatorze genetycznym ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA). Uzyskane sekwencje nukleotydowe edytowano w programie BioEdit (Hall, 1999) i porównano z danymi GenBank w programie BLAST-NCBI. Analiza filogenetyczna otrzymanych sekwencji i odpowiadających im sekwencji GenBank została przeprowadzona przez estymację Neighbor Joining w MEGA 10.1.17 (Kumar et al., 2018). Wartości ufności Bootstrap do szacowania niezawodności rozgałęzień obliczono w 10 000 powtórzeń.

6. Wyniki

6.1. Czynniki temporalno-mikroklimatyczne wpływają na fenologię *Lipoptena fortisetosa* w Europie Środkowej

Pierwsze muchówki zidentyfikowane jako L. *fortisetosa* zebrano 7 maja 2019 r. i 2 czerwca 2020 r. Podczas badań terenowych pozyskano łącznie 1995 osobników (M = 14,25; ME = 14,5; SD = 10,96; SE = 0,93; V = 76,87; Min = 0; Max = 39,0; K = 0,94; Ske = 0,23), w tym 1028 (51,53%) samic i 967 (48,47%) samców. Różnice rozkładu płci w czasie nie były istotne statystycznie (dla modelu: df = 1; MS = 225,04; F = 5,38; p = 0,02; samice vs. samce: df = 1; MS = 2,61; F = 0,78; p = 0,38; samice vs. samce vs. czas: df = 1; MS = 0,047; F = 0,014; p = 0,91). Pierwsze piki liczebności strzyżaków zaobserwowano w 16 dniu 2019 r. i 35 dniu 2020 r. badań. Liczbę strzyżaków zebranych w każdym dniu pobierania próbek przedstawiono na Ryc. 6.

Ryc 6. Liczba osobników *Lipoptena fortisetosa* pobranych w każdym dniu pobierania próbek w okresie od 6 maja do 15 lipca w 2019 r. (A) i 2020 r. (B).



Legenda: y — funkcja logarytmiczna; R^2 — współczynnik determinacji.

Stwierdzono bardzo silną korelację liniową między temperaturą a liczebnością *L. fortisetosa* w środowisku. Wykazano silną korelację liniową pomiędzy wilgotnością a lotami strzyżaków. Stwierdzono umiarkowaną korelację liniową między czasem a występowaniem *L. fortisetosa*. Zaobserwowano ujemną, umiarkowaną korelację liniową między prędkością wiatru a liczebnością strzyżaków. Nie stwierdzono istotnie statystycznej korelacji pomiędzy liczebnością *L. fortisetosa* a ciśnieniem powietrza. Wyniki analizy korelacji przedstawiono w Tab. 3.

Tab. 3. Korelacje pomiędzy warunkami czasowo-mikroklimatycznymi a liczebnością *Lipoptena fortisetosa* (współczynnik korelacji *r*-Pearsona).

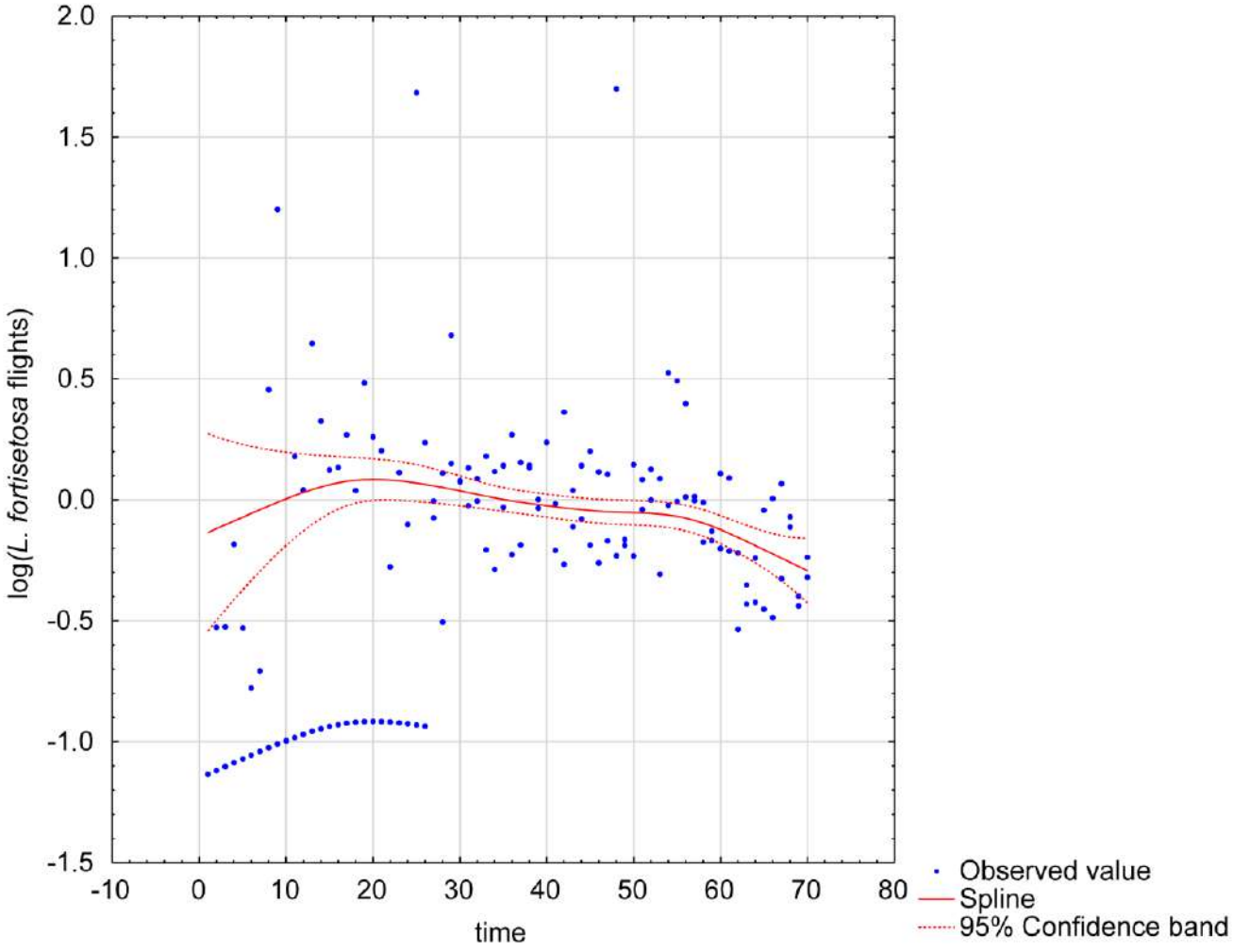
Korelacje między badanymi czynnikami		**Wartości**	
		p	***r***
Liczba osobników *Lipoptena fortisetosa*	Czas (dzień)	<0,001	0,45
	Temperatura (°C)	<0,001	0,84
	Wilgotność względna (%)	<0,001	0,76
	Ciśnienie powietrza (hPa)	0,15	−0,19
	Prędkość wiatru (km/h)	<0,001	−0,59

Legenda: wartości $p < 0,05$ uznano za statystycznie istotne.

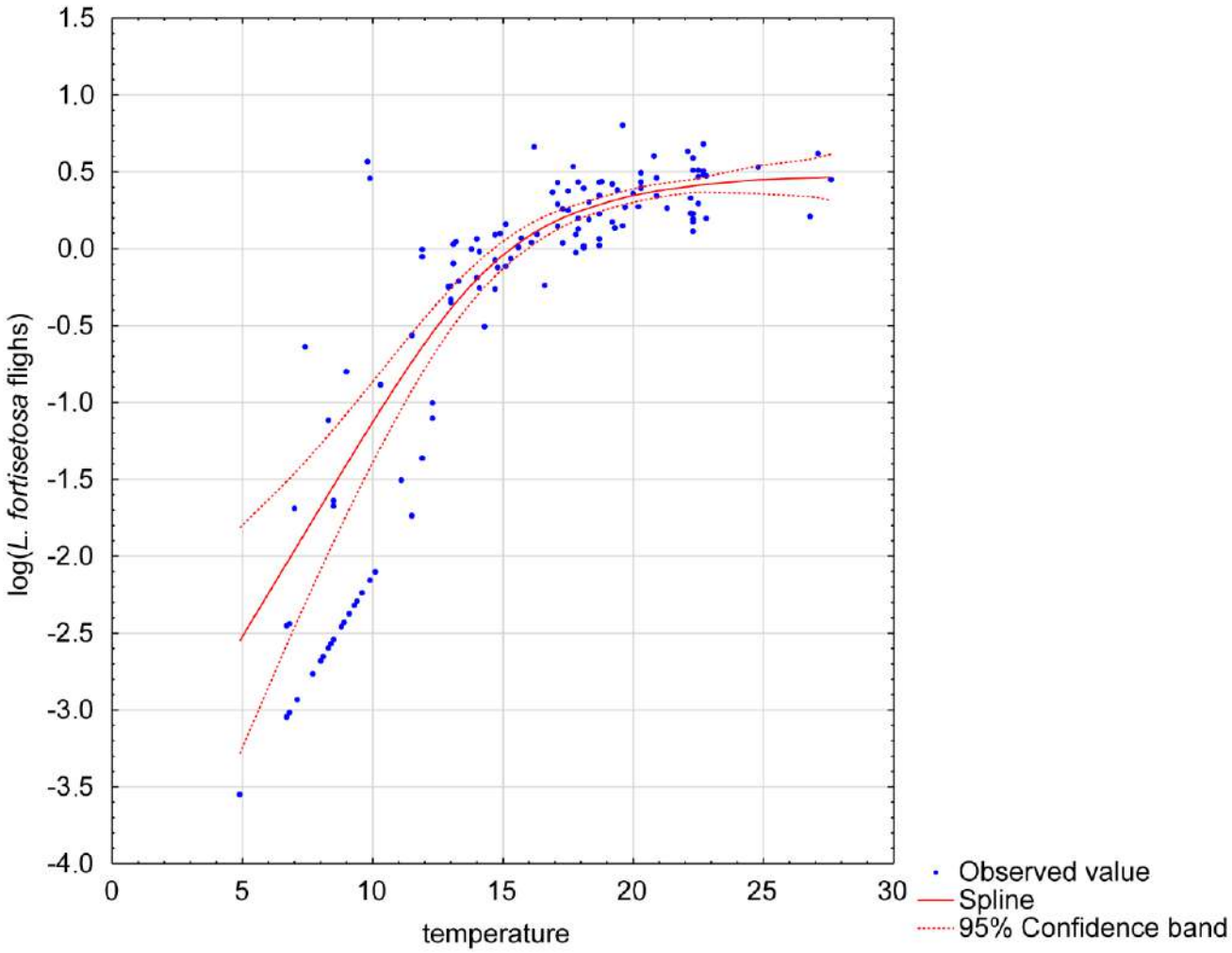
Wyniki GAM wskazują, że czas, temperatura, wilgotność względna i prędkość wiatru miały statystycznie istotny wpływ na loty muchówek. Możliwe nieliniowe efekty współzmiennych ciągłych, na liczebność *L. fortisetosa*, przedstawiono na Ryc. 7. Częstość występowania *L. fortisetosa* znacznie wzrosła między 15 a 20 dniem od rozpoczęcia lotów (Ryc. 7A), a niewielki spadek zaobserwowano w kolejnych dniach. Temperatury poniżej 5°C miały negatywny wpływ na liczebność *L. fortisetosa*. Przeprowadzone pomiary wskazują, że strzyżaki były najbardziej aktywne w temperaturze 17–22°C (Ryc. 7B). Na podstawie GAM można zaobserwować, że temperatury wyższe od 22°C, nie mają addytywnego wpływu na ich występowanie. W zaprezentowanym modelu liczebność strzyżaków była również umiarkowanie skorelowana z wilgotnością względną. Liczba ektopasożytów wykazywała tendencję do wzrostu wraz ze wzrostem wilgotności. Zwiększona aktywność strzyżaków była względnie stabilna w zakresie wilgotności 70–80% (Ryc. 7C). Optymalna prędkość wiatru dla *L. fortisetosa* wynosiła 4–12 km/h (Ryc. 7E), a większe prędkości wiatru miały negatywny wpływ na liczebność opisywanych owadów. Ciśnienie powietrza nie było statystycznie istotnie skorelowane z występowaniem *L. fortisetosa* (Ryc 7D). Wyniki GAM przedstawiono w Tab. 4. Wyniki walidacji modelu przedstawiono w Tab. 5.

A

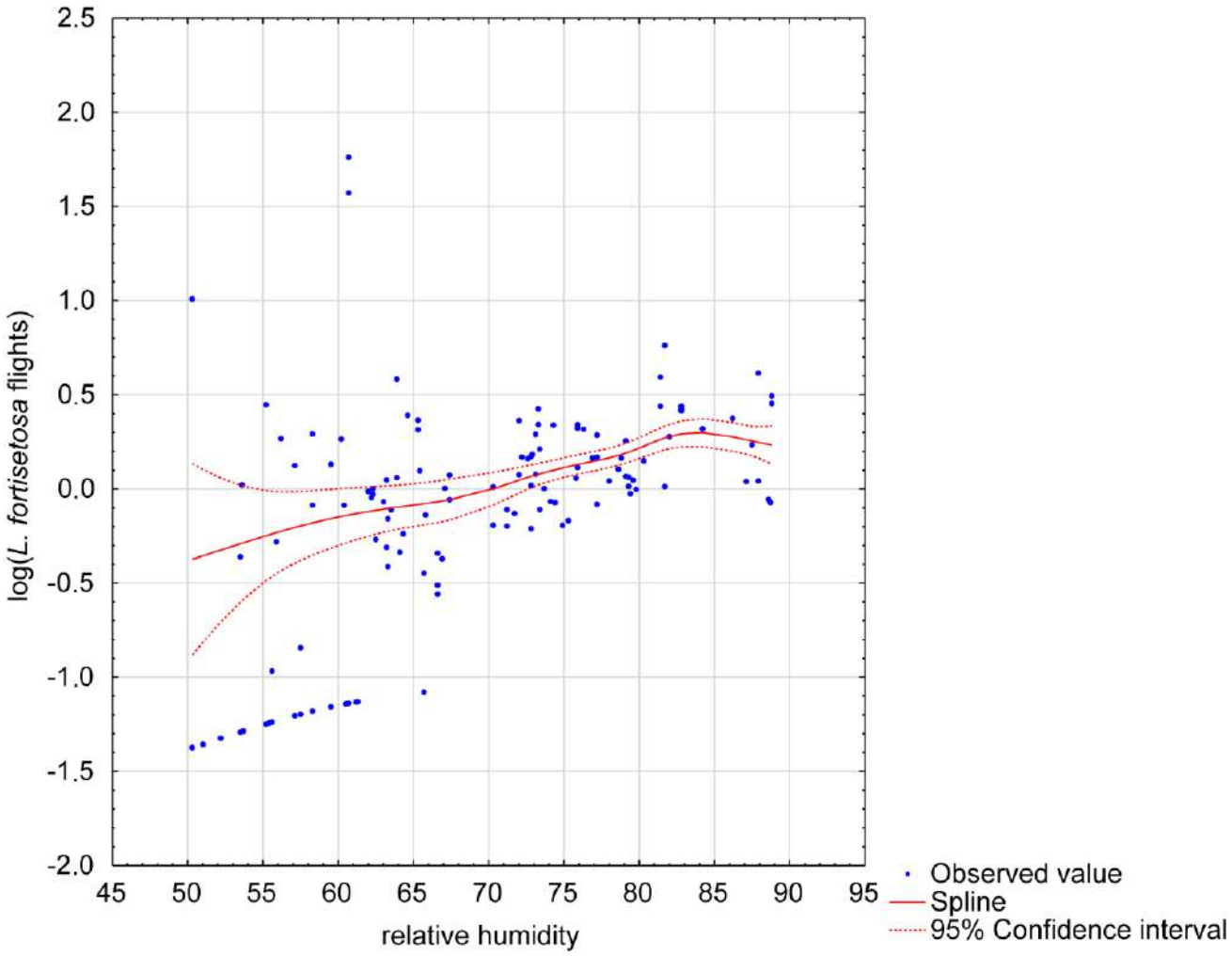
Ryc. 7. Nieliniowe efekty współzmiennych ciągłych, wpływających na liczebność *Lipoptena fortisetosa*.



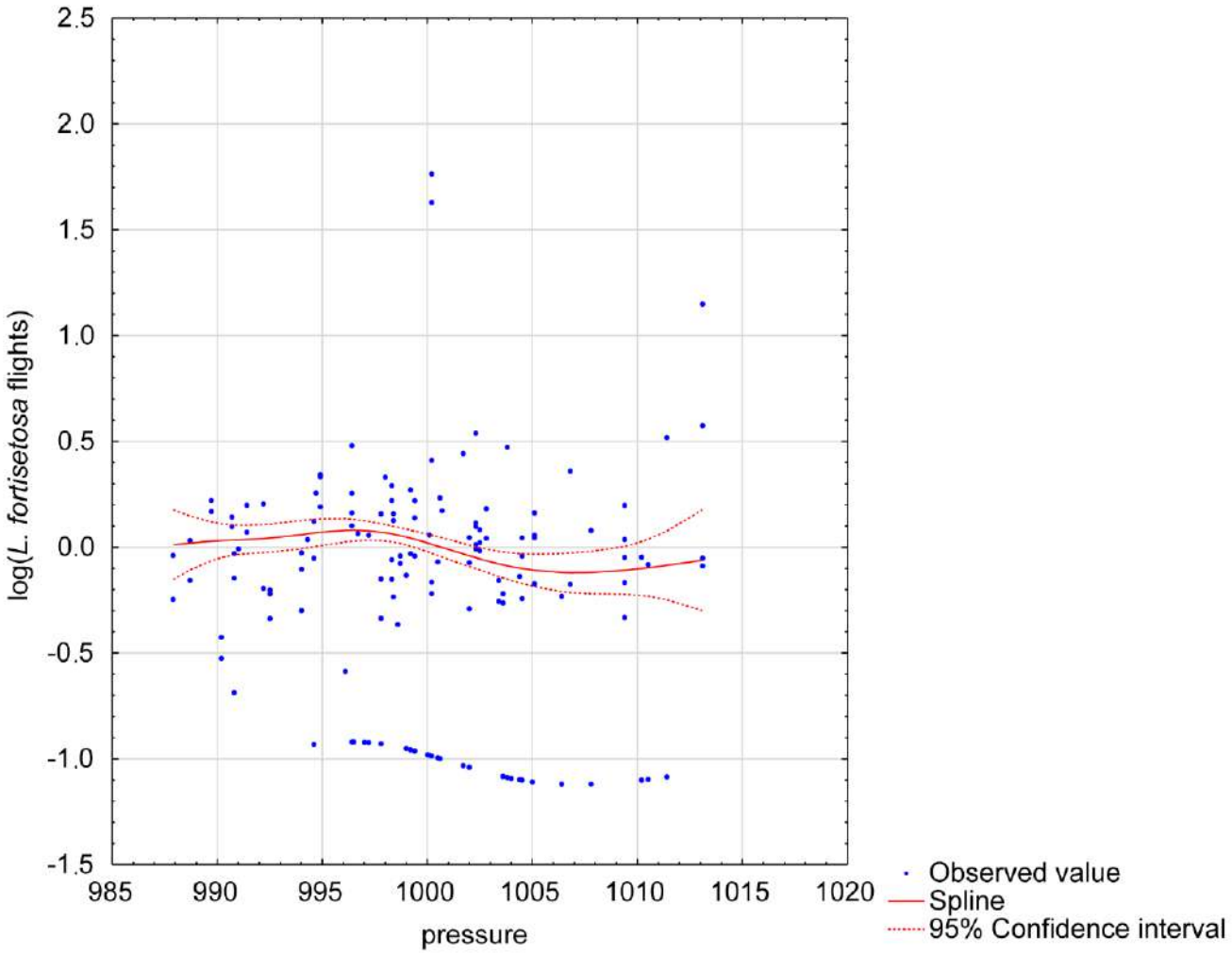
B


log(*L. fortisetosa* fligh)
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
-2.5
-3.0
-3.5
-4.0
0
5
10
15
20
25
30
temperature
Observed value
Spline
95% Confidence band

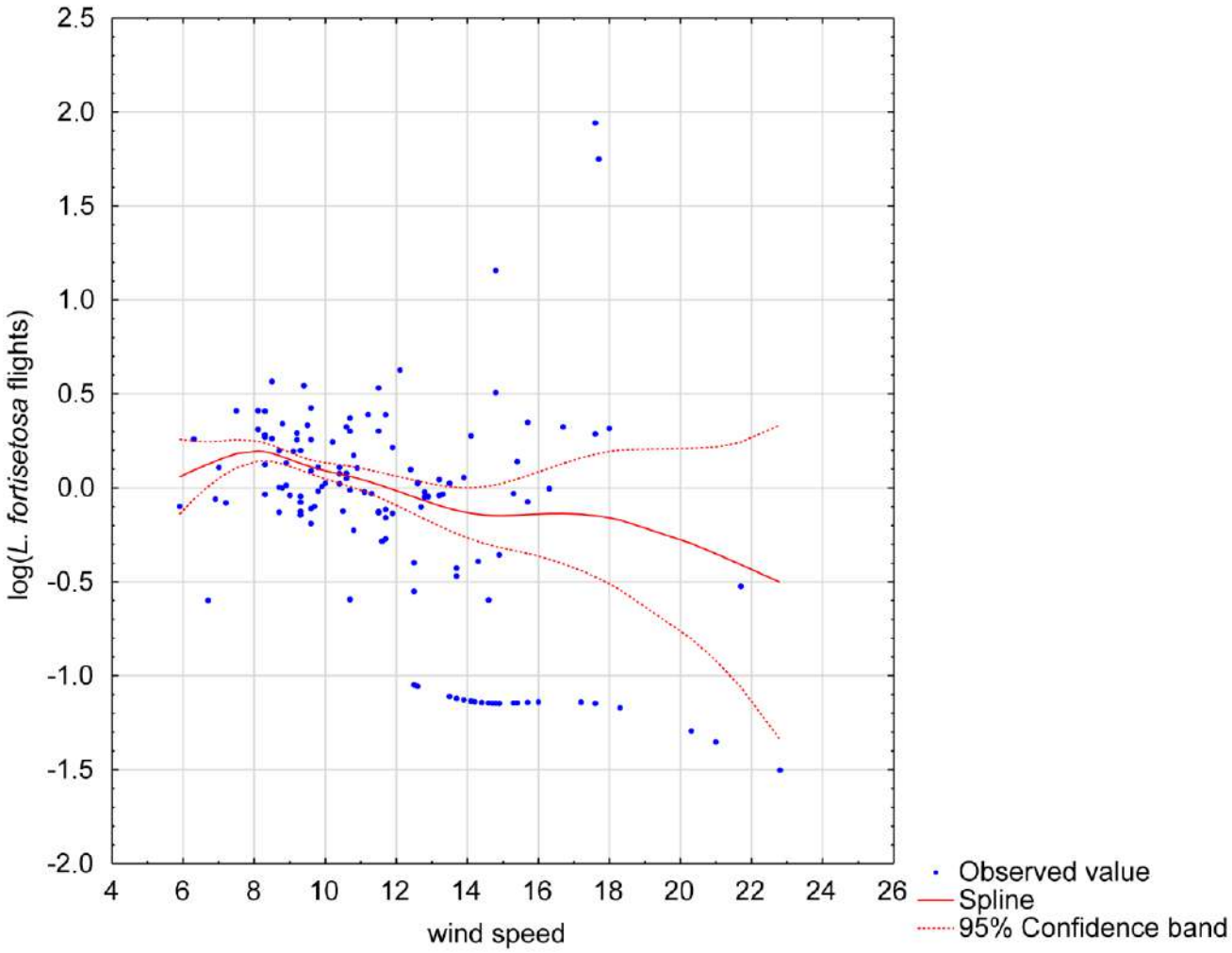
C


log(*L. fortisetosa* flights)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
relative humidity
Observed value
Spline
95% Confidence interval

D


log(L. fortisetosa flights)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
985
990
995
1000
1005
1010
1015
1020
pressure
Observed value
Spline
95% Confidence interval

E



Legenda: wykresy przedstawiają wyniki interpolacji dwuwymiarowej splajnu sześciennego z obserwowanymi wartościami predyktorów wykreślonymi względem reszt cząstkowych; (A) czas, (B) temperatura, (C) wilgotność względna, (D) ciśnienie powietrza* i (E) prędkość wiatru; * — nieistotne statystycznie.

Tab. 4. Estymacja parametrów w uogólnionym modelu addytywnego (GAM) analizująca korelacje między czynnikami czasowo-mikroklimatycznymi a liczebnością *Lipoptena fortisetosa*.

Parametry *n* = 140	Wartości				
	df	*GAM coef.*	*SE*	*SS*	*p*
Wyraz wolny	1	1,12	0,23	4,82	0,005
Czas	4,15	−0,0054	0,0013	−4,21	0,038
Temperatura	4,06	0,057	0,0068	8,39	<0,001
Wilgotnośc względna	4,02	0,017	0,0029	5,29	0,041
Ciśnienie powietrza	4,04	−0,0086	0,0035	−2,42	0,074
Prędkość wiatru	3,94	−0,026	0,0088	−3,04	0,003

Legenda: *n* — liczba pomiarów; *df* – stopnie swobody; GAM coef. — współczynnik uogólnionego modelu addytywnego; *SE* — błąd standardowy; *SS* — standaryzacja; $p < 0,05$ uznano za statystycznie istotne.

Tab. 5. Walidacja uogólnionego modelu addytywnego (GAM) w różnych lokalizacjach.

Lokalizacja *n* = 12	Temperatura		Wilgotność względna		Ciśnienie powietrza		Prędkość wiatru	
	°C	log	%	log	hPa	log	km/h	log
I	18,1	0,29	72,6	0,11	1002,4	0,44	13,3	−0,17
	19,5	0,40	77,8	0,17	1001,2	0,48	14,7	−0,26
	15,2	−0,06	68,2	0,07	998,5	0,22	8,2	0,28
II	19,3	0,27	62,4	−0,06	1001,6	−0,19	15,5	−0,07
	17,9	0,23	64,3	−0,13	997,3	0,05	8,0	0,34
	20,6	0,36	67,7	0,002	1000,6	0,12	10,2	0,09
III	22,3	0,41	74,8	0,29	1002,7	−0,29	8,9	0,05
	21,7	0,34	76,0	0,14	1005,2	0,33	6,8	0,21
	18,8	0,12	71,9	−0,03	1003,7	−0,16	10,6	0,04
IV	22,3	0,33	67,8	0,05	1000,8	−0,31	16,1	−0,32
	17,4	0,12	70,4	−0,08	999,2	0,25	10,3	0,08
	19,1	0,28	71,3	0,16	1003,4	−0,07	10,2	0,05

Legenda: n — liczba pomiarów; I-IV — badane lokalizacje; log — log (loty *L. fortisetosa*)

6.2. Charakterystyka molekularna osobników *Lipoptena fortisetosa* pozyskanych ze środowiska w północno-wschodniej Polsce

Reprezentatywne sekwencje *L. fortisetosa* zostały zdeponowane w bazie danych GenBank NCBI za pomocą narzędzia BankIt pod numerami dostępu MT182645-MT182661, MT182663. W sumie w miejscach pobierania próbek pobrano 482 próbki *Lipoptena* spp. (*M* = 80,33; *ME* = 79,5; *SD* = 12,39; *SE* = 5,06; *V* = 15,43; *Min* = 61; *Max* = 96). Spośród nich 385 zidentyfikowano jako *L. cervi* (*M* = 64,17; *ME* = 67; *SD* = 9,26; *SE* = 3,78; *V* = 14,43; *Min* = 47; *Max* = 72), w tym 196 samic (50,9%) i 189 samców (49,1%). Nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych w proporcji płci u *L. cervi* ($p = 0,74$). *Lipoptena fortisetosa* została zarejestrowana we wszystkich sześciu lokalizacjach. W sumie zidentyfikowano 97 osobników *L. fortisetosa* (*M* = 16,17; *ME* = 15,5; *SD* = 5,53; *SE* = 2,56; *V* = 34,20; Min = 8; Max = 24), w tym 51 samic (52,58%) i 46 samców (47,42%). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w proporcjach płci ($p = 0,65$). Ogólna populacja *L. cervi* i *L. fortisetosa* z badanych

lokalizacji różniła się istotnie pod względem wielkości ($p < 0,001$). Szczegółowe wyniki przedstawiono w Tab. 6.

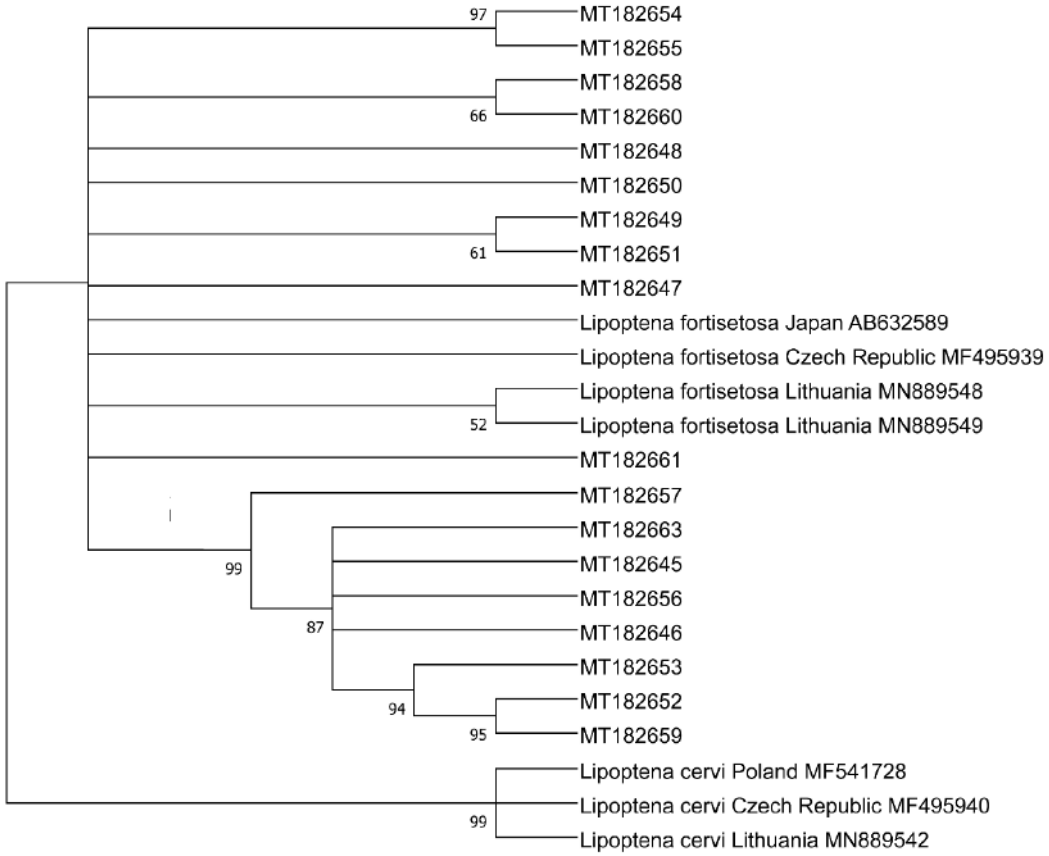
Tab. 6. Liczba strzyżaków zebranych w miejscach poboru próbek, z podziałem na gatunki i płeć.

Lokalizacja	*Lipoptena cervi*		*Lipoptena fortisetosa*		Suma
	M	F	M	F	
Ełk	28	39	3	5	75
Gołdap	29	32	7	10	78
Jedwabno	34	33	6	8	81
Kolno	40	32	14	10	96
Pieniężno	20	27	7	7	61
Ruciane-Nida	38	33	9	11	91

Legenda: płeć: M- samce; F- samice.

Drzewo filogenetyczne przedstawiono na Ryc. 8. Długość dopasowania użytego do zbudowania drzewa filogenetycznego wynosiła 445 bp. Wykazano, że 29 sekwencji (MT182645-MT182658, MT182660-MT182661, MT182663) charakteryzowało 98,32% do 100% podobieństwa z sekwencjami *L. fortisetosa* z Czech i Litwy (MF495939, MN889549). Podobieństwo między sekwencjami MT182659 i sekwencją *L. fortisetosa* z Japonii (AB632589) osiągnęło 95,56%. Szczegółowe dane, w tym identyfikator najbliższego dopasowania, kraj pochodzenia i procent identyczności sekwencji, przedstawiono w Tab. 7.

Ryc. 8. Analiza filogenetyczna genu rRNA 16S u *Lipoptena fortisetosa*.



Legenda: Drzewo filogenetyczne na podstawie wyników analizy maksymalnego prawdopodobieństwa fragmentu genu rRNA 16S u *Lipoptena fortisetosa*. Zidentyfikowane unikalne haplotypy są oznaczone numerami identyfikacyjnymi sekwencji. W drzewie wskazano sekwencje referencyjne z GenBank. Wartości ufności Bootstrap do oceny wiarygodności gałęzi obliczono w 10 000 powtórzeń.

Tab. 7. Porównanie uzyskanych wyników z sekwencjami umieszczonymi w GenBank.

ID sekwencji	ID najbliższego dopasowania (Genbank)	Kraj pochodzenia	Dopasowanie procentowe	Literatura
MT182645	MF495939 MN889549	Czechy Litwa	99,56%	Radzijevskaja et al. (2020) Sochova et al. (2017)
MT182646			99,78%	
MT182647			98,68%	
MT182648			99,58%	
MT182649			99,36%	
MT182650			99,58%	
MT182651			100%	
MT182652			98,32%	
MT182653			99,04%	
MT182654			98,93%	

MT182655			98,93%	
MT182656			98,91%	
MT182657			98,43%	
MT182658			99,36%	
MT182659	AB632589	Japonia	95,56%	Hosokawa et al. (2012)
MT182660			99,36%	Radzijevskaja et al. (2020)
MT182661	MF495939	Czechy	99,15%	
MT182663	MN889549	Litwa	98,91%	Sochova et al. (2017)

6.3. Charakterystyka molekularna osobników *Lipoptena cervi* pozyskanych ze środowiska w Polsce

Reprezentatywne sekwencje *L. cervi* uzyskane w tym badaniu zostały zdeponowane w bazie danych GenBank NCBI. Sekwencjom przypisano numery indentyfikacyjne MT337409 – MT337416. Sekwencje uzyskane z GenBank a następnie wykorzystane w analizie filogenetycznej zostały wymienione w Tab. 8.

Tab. 8. Sekwencje wykorzystane przy analizie filogenetycznej próbek DNA pozyskanych od *Lipoptena cervi*.

ID sekwencji	Gatunek	Kraj pochodzenia	Literatura
MT337409- MT337416	*Lipoptena cervi*	Polska	Badania własne
MF541726–MF541729	*Lipoptena cervi*	Polska	Szewczyk et al. (2017)
MF495940	*Lipoptena cervi*	Czechy	Sochova et al. (2017)
AF322437	*Lipoptena cervi*	Czechy	Nirmala et al. (2001)
DQ133043	*Lipoptena cervi*	Niemcy	Dittmar et al. (2006)
MN889542- MN889544	*Lipoptena cervi*	Litwa	Radzijevskaja et al. (2020)
EF531114	*Lipoptena cervi*	Dania	Petersen et al. (2007)

W województwie wielkopolskim wykryto trzy haplotypy (MT337410, MT337413, MT337416). W województwie kujawsko-pomorskim znaleziono cztery haplotypy (MT337409, MT337410, MT337413, MT337415). W województwie lubuskim pozyskano trzy haplotypy (MT337410, MT337412, MT337413). W województwie pomorskim zidentyfikowano trzy haplotypy (MT337410, MT337413, MT337414), a dwa (MT337410, MT337411) w województwie warmińsko-mazurskim. Szczegółowy rozkład haplotypów w badanych lokalizacjach przedstawia Tab. 9.

Tab. 9. Charakterystyka molekularna *Lipoptena cervi* w badanych stanowiskach.

Lipoptena cervi o poszczególnych haplotypach w badanych województwach					
Wykryte haplotypy	wielkopolskie (n = 7)	kujawsko-pomorskie (n = 7)	lubuskie (n = 7)	pomorskie (n = 7)	warmińsko-mazurskie (n = 7)
MT337409	-	1	-	-	-

MT337410	4	3	3	3	5
MT337411	-	-	-	-	2
MT337412	-	-	2	-	-
MT337413	2	1	2	3	-
MT337414	-	-	-	1	-
MT337415	-	2	-	-	-
MT337416	1	-	-	-	-

W uzyskanych sekwencjach, międzygatunkowe parowane odległości genetyczne wahały się od 0,000 do 0,0496 (*M* = 0,0135; *SD* = 0,0149; *SE* = 0,0006; *V* = 110,11). Średnie zróżnicowanie międzypopulacyjne wyniosło d = 0,0135 (*SE* = 0,0027). Średnie odległości genetyczne w obrębie województw wynosiły: *d* = 0,013 (*SE* = 0,003) dla województwa wielkopolskiego; *d* = 0,004 (*SE* = 0,002) dla województwa kujawsko-pomorskiego; *d* = 0,018 (*SE* = 0,004) dla województwa lubuskiego; *d* = 0,021 (*SE* = 0,005) dla województwa pomorskiego; oraz *d* = 0,007 (*SE* = 0,003) dla województwa warmińsko-mazurskiego. Średnie odległości genetyczne między województwami przedstawiono w Tab. 10.

Tab. 10. Średnie odległości genetyczne w wojewódzkich populacjach *Lipoptena cervi*.

	Średnie odległości genetyczne (*d*)				
Badane województwa	GP	KP	L	P	WM
GP (n = 7)	-	-	-	-	-
KP (n = 7)	0,0083	-	-	-	-
L (n = 7)	0,0159	0,0125	-	-	-
P (n = 7)	0,0199	0,0165	0,0174	-	-
WM (n = 7)	0,0099	0,0062	0,0136	0,0169	-

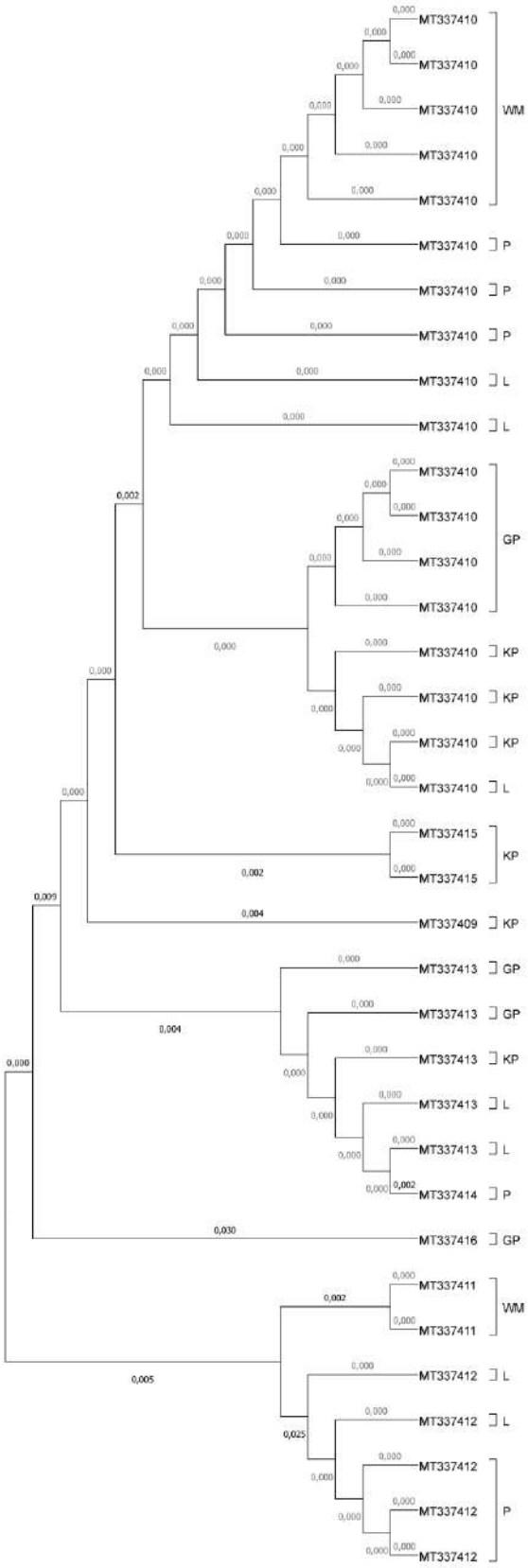
Legenda: GP - wielkopolskie; KP - kujawsko-pomorskie; L - lubuskie; P - pomorskie; WM - warmińsko-mazurskie; n - liczba próbek

Średnie współczynniki ewolucyjne w tych kategoriach wynosiły 0,00, 0,00, 0,00, 0,03 i 4,97 podstawień na miejsce. Częstości nukleotydów określono na: A = 37,55%, T = 38,82%, C = 9,54%, G = 14,10%. Osiem sekwencji (MT337409-MT337416) charakteryzowało się 97,24%% do 100% podobieństwem z sekwencjami *L. cervi* z Polski i Litwy (MF541726, MF541729, MN889544, MN889544). Nie znaleziono podobieństw między zidentyfikowanymi sekwencjami a haplotypami wykrytymi w Danii i Niemczech (Dittmar et al., 2006; Petersen et al., 2007). Szczegółowe dane, w tym identyfikator najbliższego dopasowania, kraj pochodzenia i procent identyczności sekwencji, przedstawiono w Tab. 11. Drzewa filogenetyczne przedstawiono na Ryc. 9 i 10.

Tab. 11. Porównanie uzyskanych sekwencji z sekwencjami umieszczonymi w GenBank.

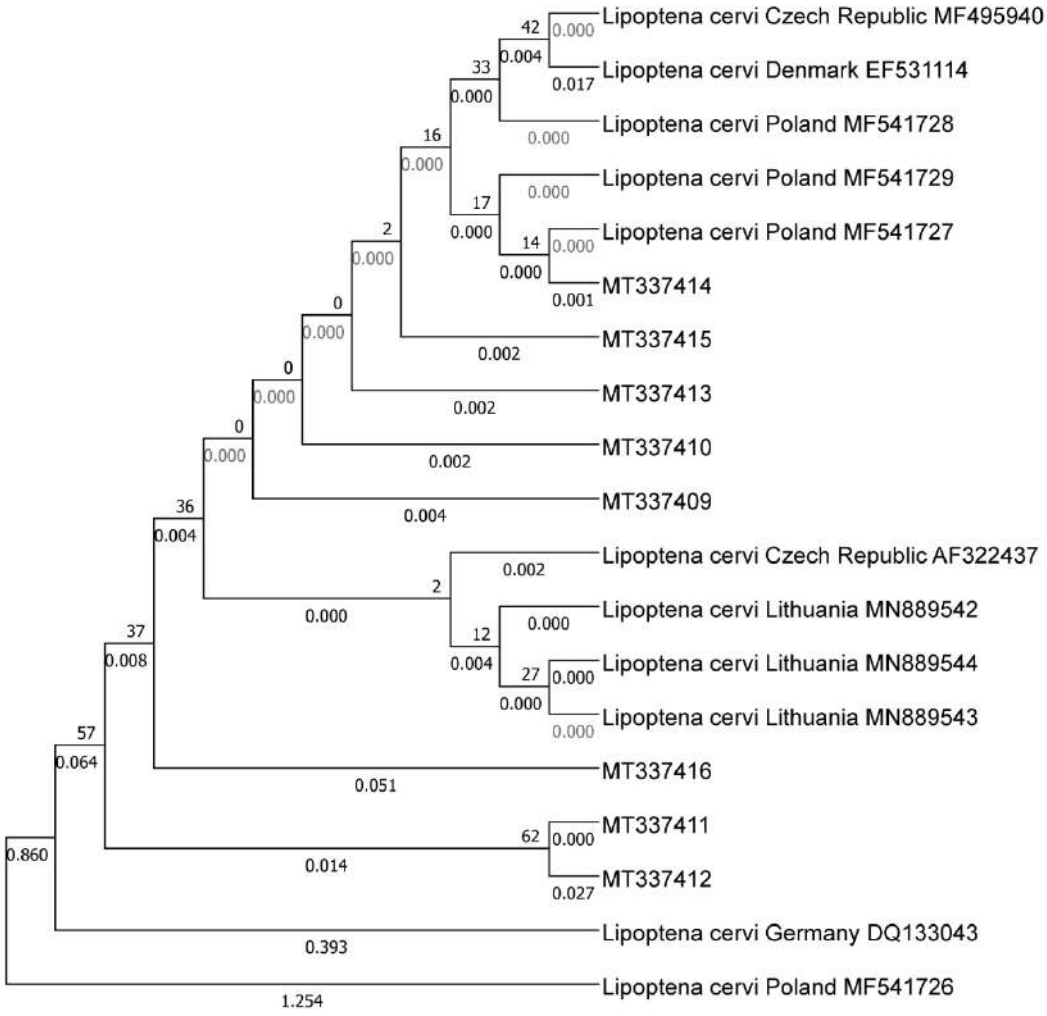
ID sekwencji	ID najbliższego dopasowania (Genbank)	Kraj pochodzenia	Dopasowanie procentowe	Literatura
MT337409	MF541726	Polska	99,51%	Szewczyk et al. (2017) Radzijevskaja et al. (2020)
	MN889542	Litwa	99,58%	
MT337410	MF541726	Polska	100%	
	MN889544	Litwa	100%	
MT337411	MF541729	Polska	99,51%	
	MN889544	Litwa	99,36%	
MT337412	MF541726	Polska	97,46%	
	MN889542	Litwa	97,24%	
MT337413	MF541726	Polska	100%	
	MN889542	Litwa	99,79%	
MT337414	MF541726	Polska	100%	
	MN889542	Litwa	99,79%	
MT337415	MF541726	Polska	100%	
	MN889542	Litwa	99,79%	
MT337416	MF541726	Polska	98,06%	
	MN889544	Litwa	98,01%	

Ryc. 9. Analiza filogenetyczna genu rRNA 16S *Lipoptena cervi* w badanych województwach.



Legenda: Topologia filogenetyczna do analizy maksymalnego prawdopodobieństwa częściowej sekwencji genu rRNA 16S *Lipoptena cervi*. Unikalne haplotypy zidentyfikowane w badaniu są oznaczone odpowiednimi numerami identyfikacyjnymi sekwencji. Wartości ufności Bootstrap dla niezawodności rozgałęzień obliczono w 10 000 powtórzeń. GP - województwo wielkopolskie; KP - województwo kujawsko-pomorskie; L - województwo lubuskie; P - województwo pomorskie; WM - województwo warmińsko-mazurskie.

Ryc. 10. Analiza filogenetyczna genu rRNA 16S *Lipoptena cervi* względem innych sekwencji.



Legenda: Topologia filogenetyczna do analizy maksymalnego prawdopodobieństwa częściowej sekwencji genu 16S rRNA *Lipoptena cervi*. Unikalne haplotypy zidentyfikowane w tym badaniu są oznaczone odpowiednimi numerami identyfikacyjnymi sekwencji. Sekwencje referencyjne dostępne w GenBank są wskazane w drzewie. Wartości ufności Bootstrap dla niezawodności rozgałęzień obliczono w 10 000 powtórzeń.

6.4. Molekularna identyfikacja wybranych patogenów o potencjale zoonotycznym u *Lipoptena fortisetosa*

W sumie zidentyfikowano 9 z 10 analizowanych patogenów, w tym 5 w grupie E i 9 w grupie A. W grupie A zidentyfikowano: *A. phagocytophilum* w 20 (8%) próbkach, *Babesia* spp. – w 51 (20,4%) próbkach, *Bartonella* spp. – w 158 (63,2%) próbkach, *Borrelia* spp. – w 12 (4,8%) próbkach, *Coxiella* spp. – w 12 (4,8%) próbkach, *Francisella* spp. – w 7 (2,8%) próbkach, *Mycoplasma* spp. – w 74 (29,6%), próbkach *Rickettsia* spp. – w 76 (30,4%) próbkach i *Theileria* spp. – w 49 (19,6%) próbkach. W grupie E zidentyfikowano *Bartonella* spp. w 89 (35,6%) próbkach, *Coxiella* spp. – w 3 (1,2%) próbkach, *Francisella* spp. – w 2 (0,8%) próbkach, *Mycoplasma* spp. – w 17 (6,8%) próbkach, a *Rickettsia* spp. – w 30 (12%) próbkach. Szczegółowe dane przedstawiono w Tab. 12.

Tab. 12. Prewalencja wybranych patogenów u *Lipoptena fortisetosa* z podziałem na województwa, grupy i płeć.

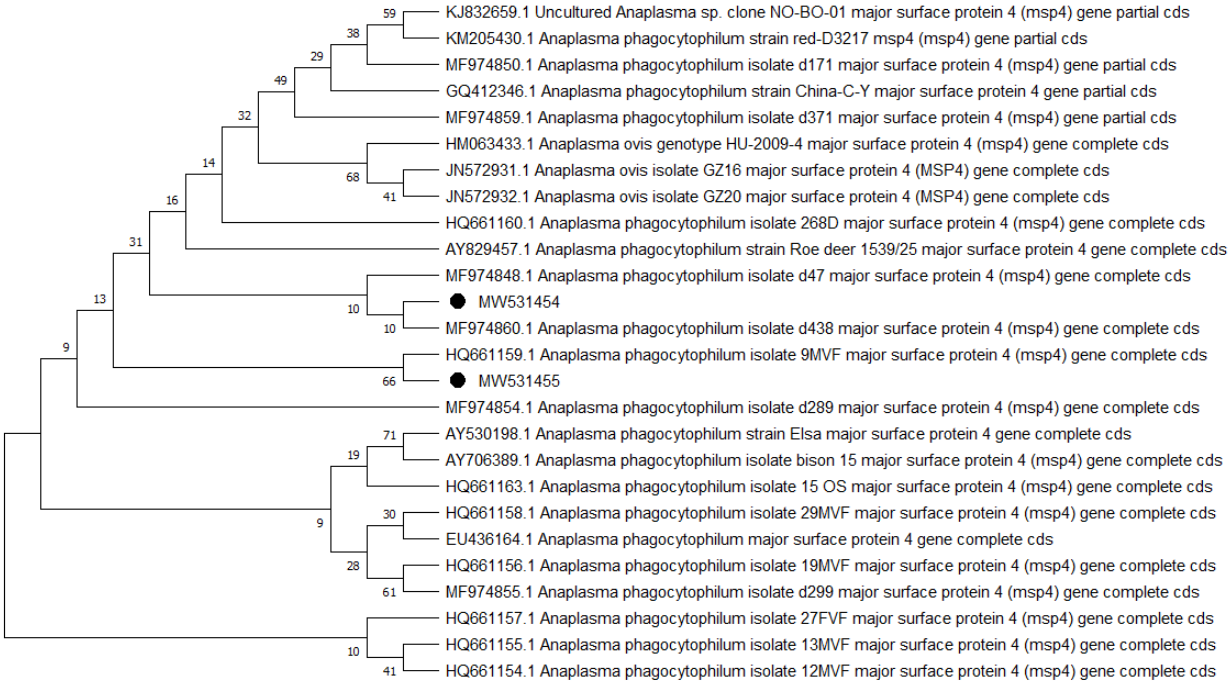
Gatunki	Grupa A		Grupa E		Suma
	n- 250		n- 250		n- 500
	M	F	M	F	
	n- 99	n-151	n- 115	n-135	
Anaplasma ovis	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Anaplasma phagocytophilum	6 (6,0%)	14 (9,3%)	0 (0%)	0 (0%)	20 (4%)
Babesia spp.	21 (21,21%)	30 (19,86%)	0 (0%)	0 (0%)	51 (10,2%)
Bartonella spp.	64 (64,65%)	94 (62,25%)	37 (32,17%)	52 (38,52%)	247 (49,4%)
Borrelia spp.	3 (3,03%)	9 (6,6,%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (24,30%)
Coxiella spp.	3 (3,03%)	9 (6,6,%)	1 (2,87%)	2 (1,48%)	15 (3%)
Francisella spp.	2 (2,02%)	5 (3,31%)	0 (0%)	2 (1,48%)	9 (1,8%)
Mycoplasma spp.	22 (22,22%)	52 (34,44%)	9 (7,82%)	8 (5,93%)	91 (18,2%)
Rickettsia spp.	30 (30,30%)	46 (30,46%)	14 (12,17%)	16 (3,2%)	106 (21,2%)
Theileria spp.	22 (22,22%)	27 (17,88%)	0 (0%)	0 (0%)	49 (9,8%)

Legenda: A – owady pozyskane od zwierząt; E - grupa pozyskana ze środowiska; M - samiec; F – samica.

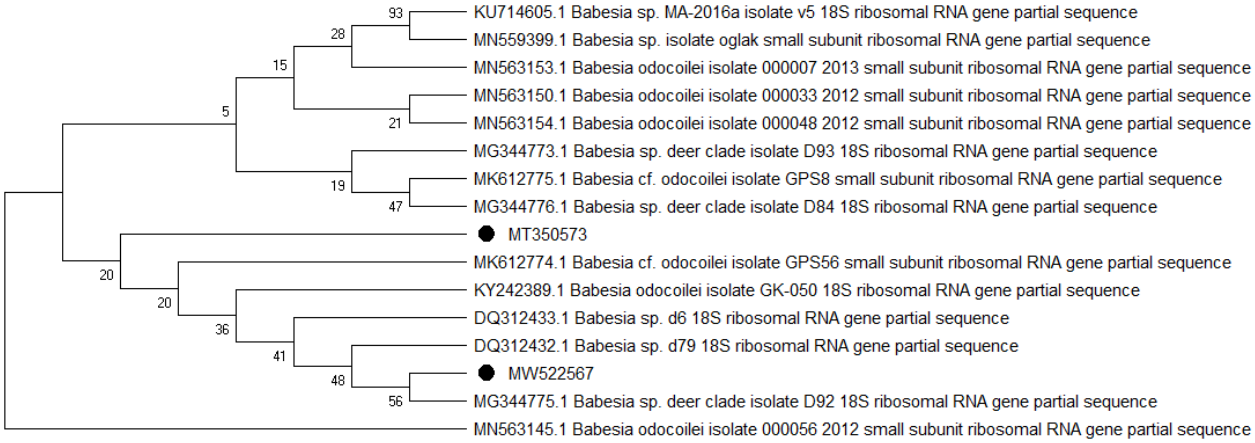
Reprezentatywne sekwencje wybranych patogenów zostały zdeponowane w bazie danych GenBank Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej pod następującymi numerami dostępu: *A. phagocytophilum* MW531454, MW531455; *Babesia* spp. MT350573, MW522567; *Bartonella* spp MW531456, MW531457; *Borrelia* spp. MW531458, MW531459; *Coxiella* spp. MW526947, MW526948; *Francisella* spp. MW531460; *Mycoplasma* spp. MW547438, MW547439; *Rickettsia* spp.

MW531461, MW531462; *Theileria* spp. MW531681, MW531682. Drzewa filogenetyczne dla otrzymanych sekwencji przedstawiono Ryc. 11-20.

Ryc. 11. Topologia filogenetyczna *Anaplasma phagocytophilum*, wykonana przy użyciu metody Neighbour Joining dla sekwencji genu MSP4. Unikalne haplotypy zidentyfikowane w tym badaniu oznaczono odpowiednimi numerami identyfikacyjnymi sekwencji i kropkami. W drzewie wskazano sekwencje referencyjne pozyskane z GenBank. Wartości ufności Bootstrap dla niezawodności rozgałęzień obliczono dla 10 000 powtórzeń.



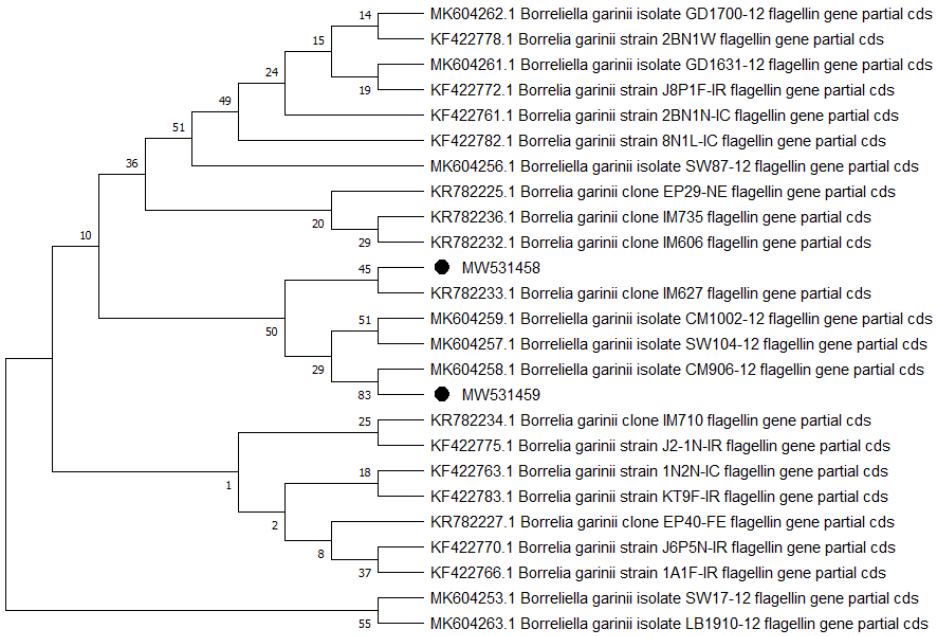
Ryc. 12. Topologia filogenetyczna *Babesia* spp., wykonana przy użyciu metody Neighbour Joining dla częściowej sekwencji genu 18S rRNA. Unikalne haplotypy zidentyfikowane w tym badaniu oznaczono odpowiednimi numerami identyfikacyjnymi sekwencji i kropkami. W drzewie wskazano sekwencje referencyjne pozyskane z GenBank. Wartości ufności Bootstrap dla niezawodności rozgałęzień obliczono dla 10 000 powtórzeń.



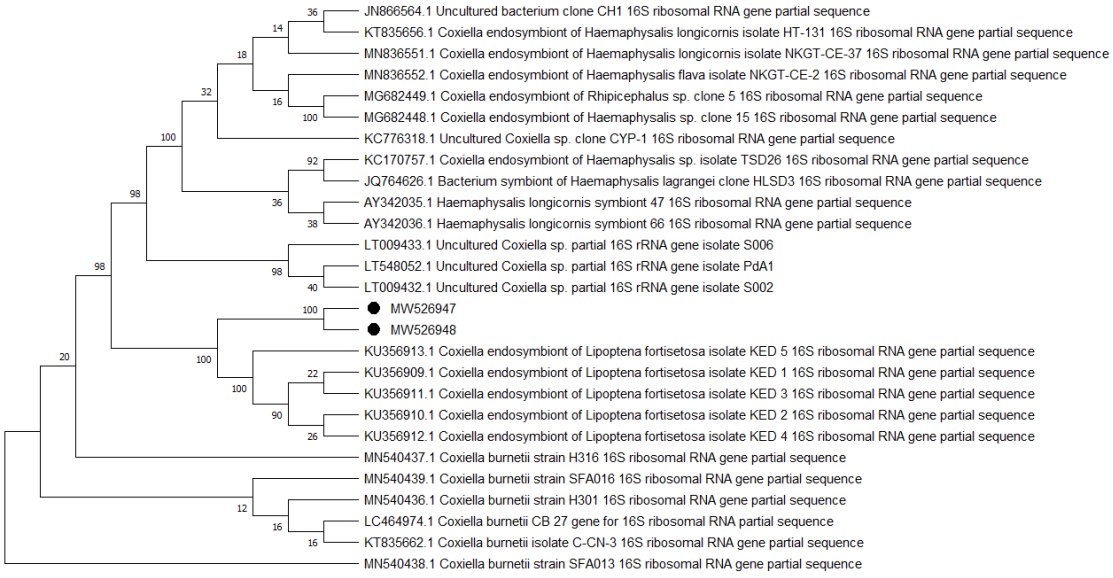
Ryc. 13. Topologia filogenetyczna *Bartonella* spp., wykonana przy użyciu metody Neighbour Joining dla częściowej sekwencji genu 16-23S. Unikalne haplotypy zidentyfikowane w tym badaniu oznaczono odpowiednimi numerami identyfikacyjnymi sekwencji i kropkami. W drzewie wskazano sekwencje referencyjne pozyskane z GenBank. Wartości ufności Bootstrap dla niezawodności rozgałęzień obliczono dla 10 000 powtórzeń.



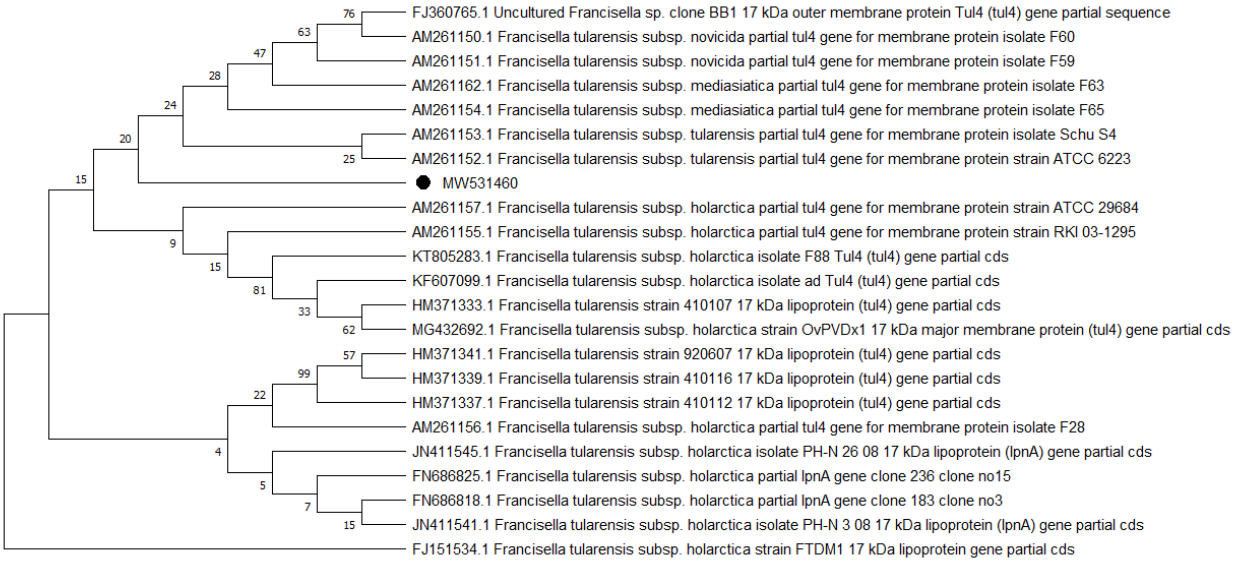
Ryc. 14. Topologia filogenetyczna *Borrelia* spp., wykonana przy użyciu metody Neighbour Joining dla częściowej sekwencji genu fla. Unikalne haplotypy zidentyfikowane w tym badaniu oznaczono odpowiednimi numerami identyfikacyjnymi sekwencji i kropkami. W drzewie wskazano sekwencje referencyjne pozyskane z GenBank. Wartości ufności Bootstrap dla niezawodności rozgałęzień obliczono dla 10 000 powtórzeń.



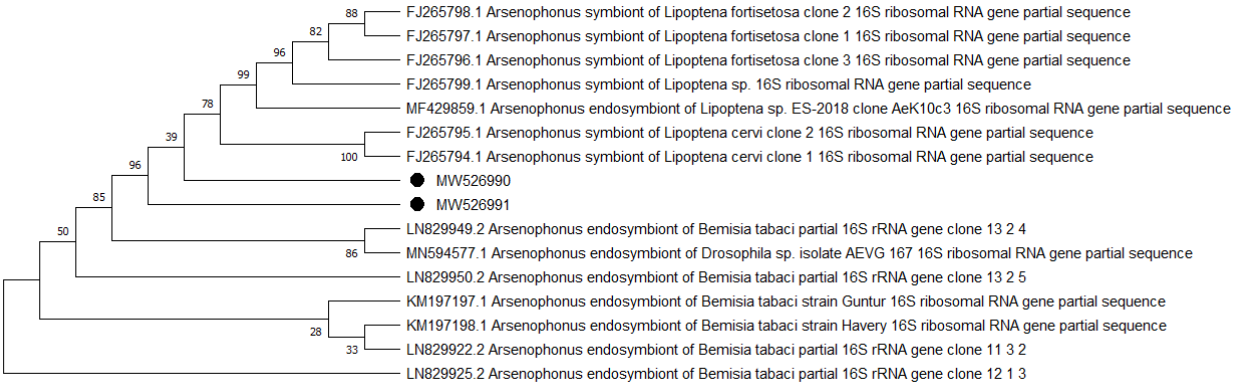
Ryc. 15. Topologia filogenetyczna *Coxiella* spp., wykonana przy użyciu metody Neighbour Joining dla częściowej sekwencji genu 16S rRNA. Unikalne haplotypy zidentyfikowane w tym badaniu oznaczono odpowiednimi numerami identyfikacyjnymi sekwencji i kropkami. W drzewie wskazano sekwencje referencyjne pozyskane z GenBank. Wartości ufności Bootstrap dla niezawodności rozgałęzień obliczono dla 10 000 powtórzeń.



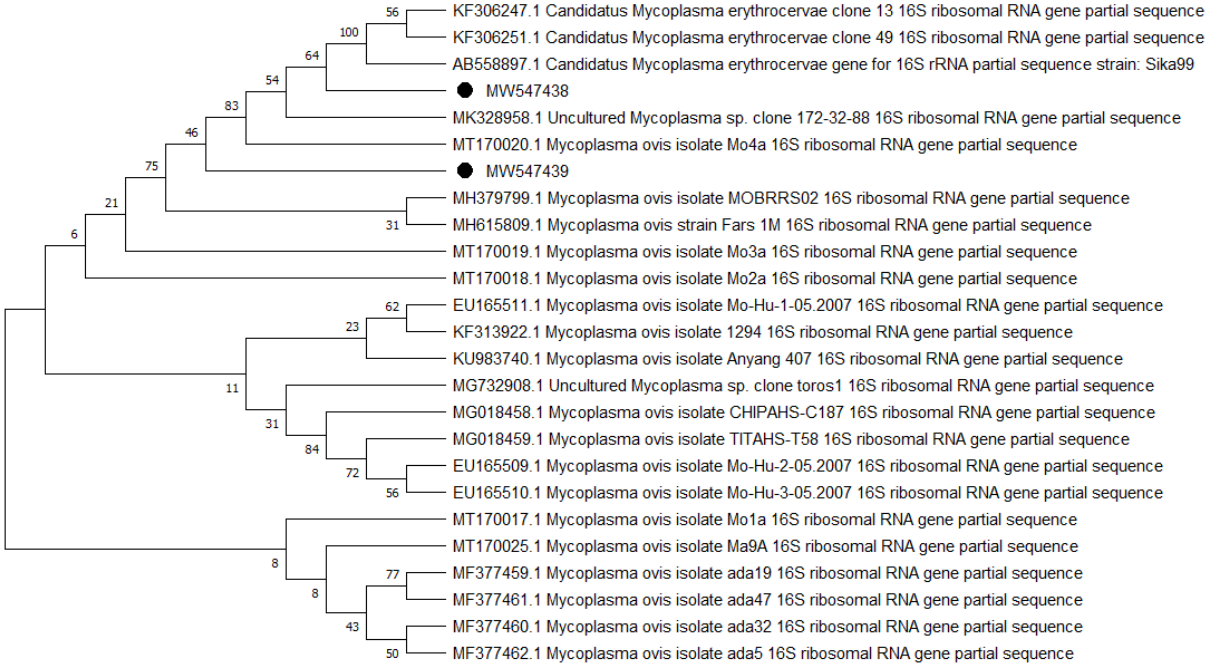
Ryc. 16. Topologia filogenetyczna *Francisella* spp., wykonana przy użyciu metody Neighbour Joining dla częściowej sekwencji genu TUL4. Unikalne haplotypy zidentyfikowane w tym badaniu oznaczono odpowiednimi numerami identyfikacyjnymi sekwencji i kropkami. W drzewie wskazano sekwencje referencyjne pozyskane z GenBank. Wartości ufności Bootstrap dla niezawodności rozgałęzień obliczono dla 10 000 powtórzeń.



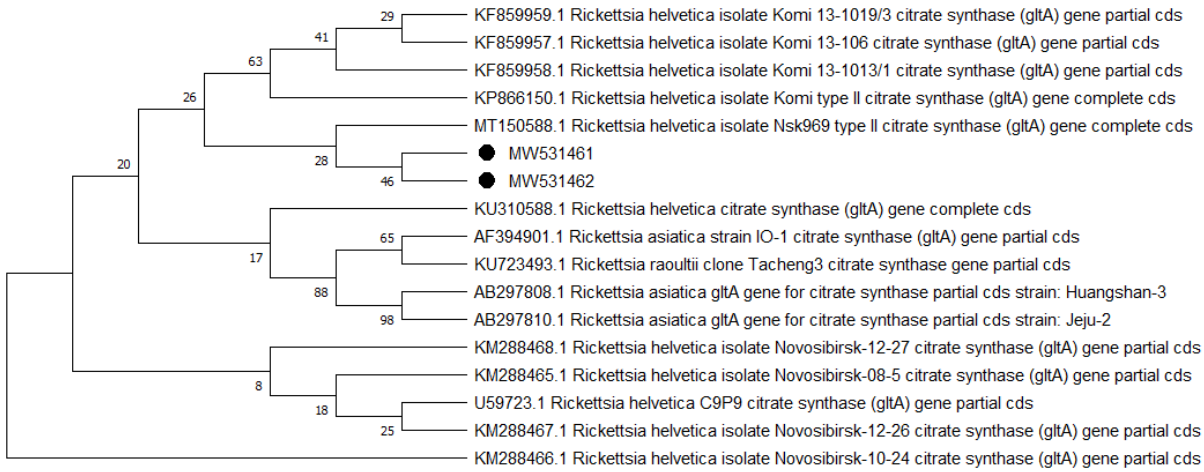
Ryc. 17. Topologia filogenetyczna *Arsenophonus* spp., wykonana przy użyciu metody Neighbour Joining dla częściowej sekwencji genu 16S rRNA. Unikalne haplotypy zidentyfikowane w tym badaniu oznaczono odpowiednimi numerami identyfikacyjnymi sekwencji i kropkami. W drzewie wskazano sekwencje referencyjne pozyskane z GenBank. Wartości ufności Bootstrap dla niezawodności rozgałęzień obliczono dla 10 000 powtórzeń. Otrzymane sekwencje uzyskano przez reakcję krzyżową.



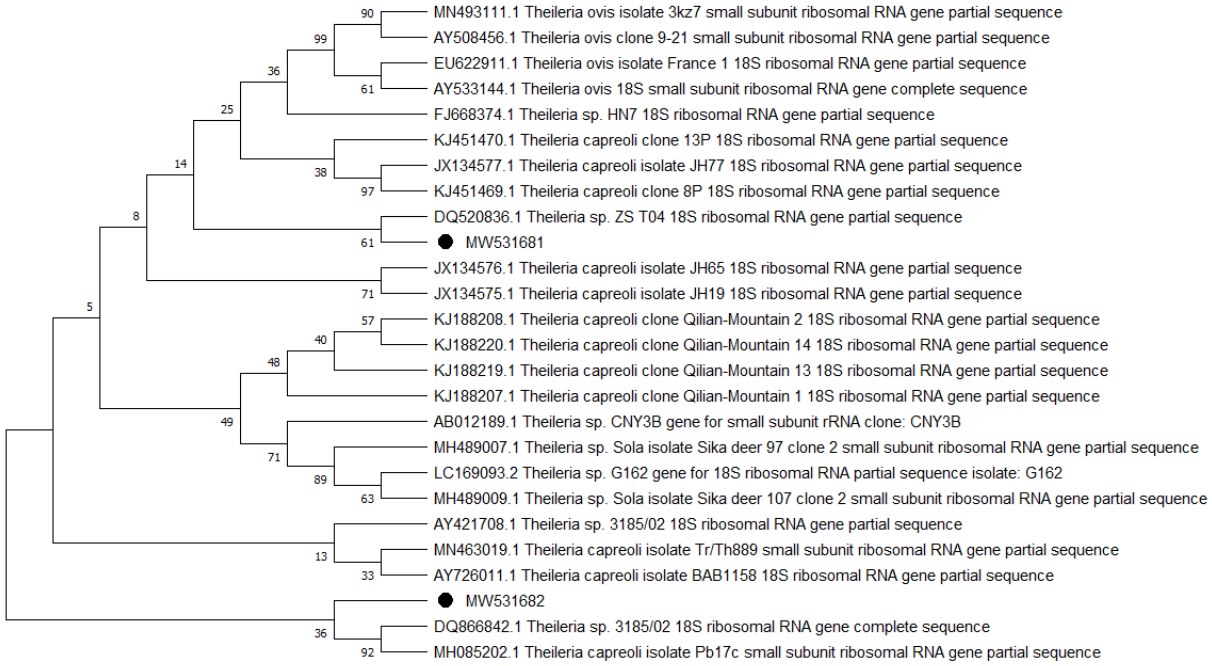
Ryc. 18. Topologia filogenetyczna *Mycoplasma* spp., wykonana przy użyciu metody Neighbour Joining dla częściowej sekwencji genu 16S rRNA. Unikalne haplotypy zidentyfikowane w tym badaniu oznaczono odpowiednimi numerami identyfikacyjnymi sekwencji i kropkami. W drzewie wskazano sekwencje referencyjne pozyskane z GenBank. Wartości ufności Bootstrap dla niezawodności rozgałęzień obliczono dla 10 000 powtórzeń.



Ryc. 19. Topologia filogenetyczna *Rickettsia* spp., wykonana przy użyciu metody Neighbour Joining dla częściowej sekwencji genu gltA. Unikalne haplotypy zidentyfikowane w tym badaniu oznaczono odpowiednimi numerami identyfikacyjnymi sekwencji i kropkami. W drzewie wskazano sekwencje referencyjne pozyskane z GenBank. Wartości ufności Bootstrap dla niezawodności rozgałęzień obliczono dla 10 000 powtórzeń.



Ryc. 20. Topologia filogenetyczna *Theileria* spp., wykonana przy użyciu metody Neighbour Joining dla częściowej sekwencji genu 18S rRNA. Unikalne haplotypy zidentyfikowane w tym badaniu oznaczono odpowiednimi numerami identyfikacyjnymi sekwencji i kropkami. W drzewie wskazano sekwencje referencyjne pozyskane z GenBank. Wartości ufności Bootstrap dla niezawodności rozgałęzień obliczono dla 10 000 powtórzeń.



Sekwencje *Anaplasma phagocytophilum* (MW531454, MW531455) charakteryzowały się 99,76% podobieństwem do sekwencji z Węgier (MF974860) i Słowacji (HQ661159). Jedna sekwencja *Babesia* spp. (MT350573) była identyczna do sekwencji *Babesia odocoilei* Emerson & Wright, 1970 udokumentowanej w Norwegii (MK612774). Druga sekwencja (MW522567) była identyczna z *Babesia* spp. pochodzącą z Czech (MG344773). Sekwencje *Bartonella* spp. (MW531456, MW531457) były identyczne z sekwencjami *Bartonella schoenbuchensis* Dehio et al., 2001 z Francji (AY116639) i Polski (EF418048, EF418052). Sekwencje *Coxiella* spp. (MW531458, MW531459)) charakteryzowały się 97,63%-97,64% podobieństwem z sekwencjami z Korei Południowej (KU356909-KU356913). Jedna sekwencja *Francisella* spp. (MW531460) była identyczna z *Francisella tularensis* subsp. holarctica z Niemiec (EF418048, EF418052). Pozostałe sekwencje *Francisella* spp. zostały zidentyfikowane jako *Arsenophonus* spp. Sekwencja *Mycoplasma* spp. (MW547438) była identyczna z sekwencją Candidatus *Mycoplasma erythrocervae* Watanabe et al., 2010 z Japonii (KF306251, KF306247, AB558897). Druga sekwencja (MW547439) była identyczna z sekwencjami *Mycoplasma ovis* Neitz et al., 1934, pochodzącymi z Węgier (EU165509) lub Turcji (MF377462). Sekwencje *Rickettsia* spp. (MW531461, MW531462) były identyczne z sekwencjami *Rickettsia helvetica* Beati et al., 1993 z Rosji (KU310588) i Francji (U59723). Jedna sekwencja (MW531681) charakteryzowała się 99,73% podobieństwem do sekwencji *Theileria capreoli* Rukhlyadev, 1939 z Turcji (MN463019). Druga sekwencja (MW531682) była identyczna z sekwencjami z Turcji (MN463019) i Hiszpanii u jelenia importowanego z Niemiec (AY421708).

Strzyżaki pozyskane od zwierząt były częściej nosicielami patogenów niż owady pozyskane ze środowiska. Materiał genetyczny patogenów był znacznie cześciej wykrywany u samic niż samców. Wykazano, że DNA *A. phagocyphilum* było częściej identyfikowane u samic niż u samców. Materiał genetyczny *Babesia* spp. był częściej identyfikowany u *L. fortisetosa* pozyskanych w województwie warmińsko-mazurskim i lubuskim. Występowanie DNA należącego do *Bartonella* spp., *Coxiella* spp., *Mycoplasma* spp. i *Rickettsia* spp. było częstsze w grupie A niż w grupie E. Materiał genetyczny *Theileria* spp. był wykrywany rzadziej u owadów pobranych na terenie województwa lubuskiego. Szczegółowe dane przedstawia Tab. 12.

Zaobserwowano istotne statystycznie zależności w częstotliwości współwystępowania badanych patogenów. Jednak, wszystkie wartości *V*-Cramera wskazywały na brak skojarzeń lub słabe skojarzenia. Wspomniane zależności przedstawiono szczegółowo w Tab. 13.

Tab. 12. Model regresji logistycznej przedstawiający istotne statystycznie zależności między analizowanymi patogenami a płcią, grupą i lokalizacją pobierania *Lipoptena fortisetosa*.

Gatunki (wartość zależna)	Wartość *p* (dla modelu)	Wartości niezależne		*SE*	*W*	*p**	*OR*
całkowita liczba	<0.001	płeć	M	0,32	4,06	0,044	0,584
			F				1,476
		grupa	A	0,22	92,32	<0,001	8,04
			E				0,12
Anaplasma phagocytophilum		płeć	M	0,56	2,85	0,03	1,24
			F				0,88
Babesia spp.		lokalizacja	WM	0,54	4,33	0,037	3,09
			L	0,55	3,67	0,045	2,85
Bartonella spp.		grupa	A	0,20	26,04	<0,001	2,803
			E				0,36
Coxiella spp.		grupa	A	0,582	4,445	0,035	3,410
			E				0,293
Mycoplasma spp.		grupa	A	0,283	35,53	<0,001	5,40
			E				0,19
Rickettsia spp.		grupa	A	0,226	16,559	<0,001	2,51
			E				0,40
Theileria spp.		lokalizacja	L	0,653	6,483	0,011	0,19

Legenda: *- wynik uznawany za statystycznie istotny przy wartości $p < 0,05$; *SE* - błąd standardowy; *W* - współczynnik Walda; *OR* - iloraz szans; M - samiec; F - samica; A – owady pozyskane od zwierząt; E – owady pozyskane ze środowiska; WM - województwo warmińsko-mazurskie; L – województwo lubuskie.

Tab. 13. Współzależności między pomiędzy występowania analizowanych patogenów u *Lipoptena fortisetosa* obliczone na podstawie wartości *V*-Cramera.

Gatunki	*Anaplasma phagocytop-hilum*	*Babesia* spp.	*Bartonella* spp.	*Borrelia* spp.	*Coxiella* spp.	*Francisella tularensis*	*Mycoplasma* spp.	*Rickettsia* spp.	*Theileria* spp.
Anaplasma phagocytop-hilum	-	0,033 [b]	0,013 [b]	0,21* [b]	0,20* [b]	0,057 [b]	0,062 [b]	0,035 [b]	0,040 [b]
Babesia spp.	0,079 [a]	-	0,024 [b]	0,026 [b]	0,029 [b]	0,11 [b]	0,041 [b]	0,011 [b]	0,050 [b]
Bartonella spp.	0,026 [a]	0,094* [a]	-	0,005 [b]	0,016 [b]	0,037 [b]	0,029 [b]	0,009 [b]	0,04 [b]
Borrelia spp.	0,21* [a]	0,077 [a]	0,032 [a]	-	0,032 [b]	0,043 [b]	0,1 [b]	0,027 [b]	0,078 [b]
Coxiella spp.	0,16* [a]	0,010 [a]	0,037 [a]	0,043 [a]	-	0,045 [b]	0,073 [b]	0,080 [b]	0,025 [b]
Francisella spp.	0,035 [a]	0,12* [a]	0,024 [a]	0,025 [a]	0,30 [a]	-	0,063 [b]	0,059 [b]	0,041 [b]
Mycoplasma spp.	0,01 [a]	0,13* [a]	0,028 [a]	0,128* [a]	0,032 [a]	0,13 [a]	-	0,028 [b]	0,055 [b]
Rickettsia spp.	0,01 [a]	0,069 [a]	0,077 [a]	0,0080 [a]	0,11* [a]	0,039 [a]	0,050 [a]	-	0,046 [b]
Theileria spp.	0,08* [a]	0,16* [a]	0,11 [a]	0,12* [a]	0,012 [a]	0,008 [a]	0,052 [a]	0.090 [a]	-

Legenda: * - wartość $p < 0.05$ dla $\chi 2$; [a] – *V*-Cramera dla wszystkich próbek; [b] – *V*-Cramera dla owadów pozyskanych od zwierząt.

7. Dyskusja

Przeprowadzone badania wskazują, że populacja *L. fortisetosa* stale rośnie w środowisku naturalnym. Te ektopasożyty występują również w środowiskach niespecyficznych, takich jak miasta (Gałęcki et al., 2022). W przyszłości liczebność populacji *L. fortisetosa* prawdopodobnie wzrośnie i można się również spodziewać, że gatunek ten będzie kolonizował nowe ekosystemy, zarówno ze względu na zmianę klimatu, jak i penetrację dzikich przeżuwaczy na obszary antropogeniczne. Fenologia analizowanych ektopasożytów jest jednym z najważniejszych rozważań w monitoringu epidemiologicznym wektorów. Fenologia *L. cervi* została szczegółowo opisana w Europie Północnej (Mysterud et al., 2016). Nie przeprowadzono jednak takich badań w odniesieniu do inwazyjnego gatunku *L. fortisetosa*. Podobne badania nie były też prowadzone na terenie Europy Środkowej. Poprzednie obserwacje przeprowadzone w latach 2017–2018 potwierdziły występowanie *L. fortisetosa* w maju, ale nie przeprowadzono dokładnych pomiarów mikroklimatycznych. Odkrycia te różnią się od obserwacji przeprowadzonych na innych gatunkach strzyżaków. Obserwowane różnice w fenologii *Lipoptena* spp. mogą być związane ze wzrostem temperatur w Europie (Christidis et al., 2015; Ward et al., 2016). Programy monitoringu w Europie Środkowej wykazały wzrost średnich temperatur, w szczególności między styczniem a sierpniem, a także wzrost maksymalnych temperatur w latach 1961-2010 (Hoy et al., 2018).

Przeprowadzone badania potwierdziły występowanie korelacji między czynnikami czasowo-mikroklimatycznymi a liczbą muchówek poszukających nowych żywicieli. Stwierdzono silną korelacje między temperaturą a liczebnością muchówek. Istotnym czynnikiem był również czas pomiaru, ale był on znacznie słabiej skorelowany z liczbą zebranych strzyżaków niż temperatura. Podobną korelacje zaobserwowano między liczebnością *L. fortisetosa* a wilgotnością. W kolejnych dniach badań

terenowych zaobserwowano nieznaczny spadek wielkości pobranych próbek, co może wskazywać na brak nowych pokoleń tych owadów. Rozkład płci nie był skorelowany z czasem pomiarów.

Podobne korelacje między temperaturą a liczebnością *L. cervi* zostały opisane przez Härkönena i in.(Härkönen et al., 2010), Mysterud i in. (Mysterud et al., 2016) oraz Välimäki i in. (Välimäki et al., 2010). Cytowane badania były prowadzone w regionach o innym klimacie i odmiennych populacjach zwierząt niż w Polsce. Temperatura może znacząco wpłynąć na cykl rozwojowy *L. fortisetosa* poprzez zakłócenie zimowej diapauzy. Istnieje wiele przyczyn zakończenia diapauzy przez owady (Hodek & Hodková, 1988), a w opisywanym przypadku jedną z nich mogły być warunki środowiskowe. Hodek i Hodková (1988) podają, że diapauza kończy się w temperaturach pośrednich lub wysokich poprzez dużą amplitudę temperaturową, a nawet może być stymulowana przez wysoką temperaturę. Na początek sezonu, na aktywność tych muchówek mogą również wpływać krioprotektanty (Nieminen et al., 2013; Nieminen et al., 2012). W przyszłości dalszy wzrost krioprotektantów u tych owadów może zmienić korelacje między liczebnością *Lipoptena* spp. i czynnikami środowiskowymi. Krioprotektanty mogą również przyczynić się do wzrostu populacji *L. fortisetsa* poprzez zmniejszenie śmiertelności poczwarek w okresie zimowym. Należy jednak zaznaczyć, że niska temperatura odgrywa pewną rolę w cyklu życiowym strzyżaków. Härkönen i Kaitala (Härkönen & Kaitala, 2013) stwierdzili, że poczwarki *L. cervi* wymagają dłuższej ekspozycji na wysokie temperatury, aby przerwać diapauzę, jeśli okres niskich temperatur jest zbyt krótki. Zjawisko to może być główną przyczyną obserwowanych różnic w fenologii ponieważ, wysokie temperatury najprawdopodobniej wydłużały okres zimowej diapauzy.

Fotoperiodyzm może być odpowiedzialny za korelację między czasem a lotami *L. fortisetosa*. Badania w warunkach laboratoryjnych wskazują, że pojawienie się dorosłych *L. cervi* nie było skorelowane z fotoperiodem (Danks, 1987). Natomiast Mysterud i in. (Mysterud et al., 2016) sugerowali, że fotoperiod może być ważnym czynnikiem w warunkach terenowych. Ekspozycja na światło odgrywa istotną rolę w przypadku innych ektopasożytów z rodziny Hippoboscidae. Na przykład *Pseudolynchia canariensis* Macquart, 1839 rozwija się z poczwarki tylko w wybranym fotoperiodzie (Klei & Degiusti, 1975), podczas gdy loty *H. equina* są częstsze w określonych porach dnia (Sokół & Michalski, 2015). Znaczenie fotoperiodu może być również związane z silną korelacją między datą pomiaru a temperaturą. Potrzebne są dalsze badania w celu oceny wpływu fotoperiodu na aktywność *L. fortisetosa*.

Wyniki przeprowadzonych badań sugerują również, że aktywność ektopasożytów może być skorelowana ze zmianami wilgotności względnej. Moyer i in. (2002) stwierdzili, że czynniki abiotyczne, takie jak wilgotność względna, mogą wywoływać znaczące zmiany w presji ektopasożytów na populacje żywicieli. Niska wilgotność może hamować rozwój poczwarki (Danks, 1987). Według Bakhtushkina (2018), żywotność *L. cervi* wzrasta wraz ze wzrostem wilgotności. Opisywane ektopasożyty żyją najdłużej w zakresie wilgotności 60–80% i temperaturze 14–16ºC. W warunkach laboratoryjnych rozwój poczwarki trwa średnio 90 dni w temperaturze około 20–25ºC i wilgotności 60–80% (Bakhtushkina, 2018). Przeprowadzone badania wskazują, że podobne zależności mogą wystąpić w środowisku leśnym. Dlatego też wilgotność względna może być powiązana z liczbą *L. fortisetosa* poszukujących nowych żywicieli.

Wpływ ciśnienia powietrza na aktywność różnych owadów potwierdzono w wielu badaniach. Według Wellingtona (1946), spadek ciśnienia barometrycznego stymuluje ogólną aktywność muskoidów. Jednak czułość receptorów odpowiedzialnych za monitorowanie ciśnienia powietrza może być inna pośród różnych gatunków owadów (Tichy & Kallina, 2010). McFarlane i in. (McFarlane et al., 2015) odkryli, że *Frankliniella schultzei* Trybom, 1910 była zdolna do wykrywania zmian

ciśnienia atmosferycznego. U owadów mechanizmy monitorowania ciśnienia powietrza mogły ewoluować, aby zapewnić ochronę przed niekorzystnymi zjawiskami pogodowymi. Nie zaobserwowano istotnej korelacji między ciśnieniem powietrza a liczebnością strzyżaków. Pomimo braku istotnych korelacji między ciśnieniem powietrza a liczebnością owadów w prezentowanych badaniach, nie można wykluczyć tego mechanizmu. Jednak potrzebne są dalsze badania, aby określić wpływ *L. fortisetosa* na większe amplitudy ciśnienia powietrza.

Obliczone wartości *r* oraz wyniki GAM wykazały istotną korelację między liczebnością *L. fortisetosa* a prędkością wiatru. Według Härkönena i in. (2010), przydatność siedlisk w Północnej Europie do zasadzek na gospodarzy, zwłaszcza w bezdrzewnej tundrze, może być niska dla *L. fortisetosa* z uwagi na silny wiatr. Badania przeprowadzone we wschodniej Finlandii przez Paakkonen i in. (Paakkonen, 2012; Paakkonen et al., 2014) potwierdzają, że liczba strzyżaków jest ujemnie skorelowana z wietrznością. O obecności takiego związku można również wywnioskować z zachowania reniferów, które wykorzystują wietrzne szczyty górskie przede wszystkim w celu uniknięcia nękania przez ektopasożyty (Hagemoen & Reimers, 2002).

W badaniu zastosowano GAM, aby uwzględnić związki między analizowanymi współzmiennymi. Przedstawione korelacje jednak niekoniecznie świadczą o bezpośrednim związku przyczynowo-skutkowym. Możliwe, że opisane czynniki są skorelowane z nieznaną zmienną lub zbiorem zmiennych. Na liczbę pobranych osobników, a także na początek sezonu lotów, mogą mieć wpływ głębsze zmiany w systemie złożonych zmiennych środowiskowych (np. migracje jeleni) i pogodowych (np. nasłonecznienie).

Autochtoniczny gatunek *L. cervi* stanowił 79,88% pobranych próbek, co sugeruje, że jest to gatunek dominujący w regionie Warmii i Mazur. Jednak proporcje gatunków *Lipoptena* spp. powinny być regularnie monitorowane w badanym regionie ze względu na możliwy wzrost populacji *L. fortisetosa*. W Europie *L. fortisetosa* uważana jest za gatunek multiwoltywny, podczas gdy *L. cervi* za gatunek uniwoltywny (Kowal et al., 2016). Opisane powyżej zjawiska mogą wpłynąć na tempo, w jakim te populacje ektopasożytów rozwijają się i w przyszłości mogą zwiększyć liczbę osoobników *L. fortisetosa* poszukujących żywiciela. Ze względu na różnice fenologiczne między gatunkami, na liczbę zebranych osobników może mieć również wpływ miesiąc pobierania próbek. Prezentowane badania wykazały, że dorosłe osobniki *L. fortisetosa* i *L. cervi* są aktywne w tym samym czasie. Podobne wnioski ze swoich badań zasugerowali Obona i in. (2019). Żaden z przebadanych gatunków nie charakteryzował się istotnymi różnicami w proporcji płci. U około 30% gatunków ektopasożytów stosunek płci nie odbiega znacząco od jedności (Marshall, 1981). Stosunek płci *Lipoptena* spp. zamieszkujących gospodarza może jednak różnić się od odnotowanych w tym badaniu ze względu na potencjalnie krótszą długość życia samców (Marshall, 1981).

Schematy migracji *L. fortisetosa* w Europie nie zostały w pełni wyjaśnione, ale zasięg geograficzny opisywanych ektopasożytów został prawdopodobnie poszerzony przez naturalną migrację tych owadów ze wschodu. Nie można wykluczyć, że owad ten mógł zostać przywieziony do Europy wraz z importowanymi zwierzętami (Andreani et al., 2020). *Lipoptena fortisetosa* została wcześniej zidentyfikowana tylko w kilku krajach europejskich, w tym w Czechach (Zeman, 1998), Mołdawii (Metelitsa, 1989) i Polsce (Kowal et al., 2009). Ostatnie doniesienia z Estonii (Kurina et al., 2019) i Włoch (Andreani et al., 2020; Andreani et al., 2019; Salvetti et al., 2020) wskazują, że od 2017 roku zasięg geograficzny *Lipoptena* spp. rozszerzył się zarówno na północ, jak i południe. Andreani i in. (Andreani et al., 2020; Andreani et al., 2019) zasugerowali, że stosunkowo niedawna migracja osobników jelini sika lub hybryd do Włoch z sąsiednich krajów mogła przyczynić się do przenoszenia tych ektopasożytów. Nie ma jednoznacznych dowodów wskazujących, czy ta

zmiana geograficzna wynika ze wzrostu populacji jeleniowatych, czy ze zmian klimatycznych. Wpływ globalnych zmian klimatycznych na ekspansję geograficzną *Lipoptena* spp. postulowali Kurina i in. (Kurina et al., 2019). Należy jednak zauważyć, że opisywane owady są słabymi lotnikami, które w poszukiwaniu żywicieli pokonują odległość do 50 m (Paakkonen, 2012). Dlatego też, żywiciele odgrywają równie istotną rolę w migracji tych ektopasożytów. Obecność *L. fortisetosa* w bardzo zróżnicowanych regionach sugeruje również, że owady te są gatunkami eurytopowymi, tolerującymi szeroki zakres warunków środowiskowych. W przyszłości dalszy wzrost poziomu krioprotektantów może zmienić korelacje pomiędzy liczebnością *Lipoptena* spp. i czynnikami środowiskowymi. Krioprotektanty mogą również przyczynić się do wzrostu populacji *L. fortisetosa* poprzez zmniejszenie śmiertelności poczwarek zimą. Warto zauważyć, że niska temperatura też odgrywa pewną rolę w cyklu życiowym strzyżaków.

Znaczenie *Lipoptena* spp. w medycynie weterynaryjnej nie zostało w pełni ustalone, dlatego te ektopasożyty powinny zostać przebadane bardziej szczegółowo. Istniejąca wiedza na temat wpływu *L. fortisetosa* na dzikie zwierzęta jest powierzchowna, a owady te mogą w przyszłości wpłynąć na gospodarkę łowiecką. Stwierdzono, że polskie jeleniowate i inne dzikie zwierzęta były silnie zainfestowane przez narzępiki. Strzyżaki wykryto u 64% saren europejskich, 76% danieli zwyczajnych i 78% jeleni europejskich (Kadulski, 1996; Kadulski, 1998; Szczurek & Kadulski, 2004). We Włoszech Andreani i in. (2019) wykryli infestację rodzimych gatunków jeleniowatych przez *L. fortisetosa*. Stabilność populacji tego gatunku można przypisać adaptacyjnej zmienności genetycznej i korzyściom związanym z kolonizacją różnych gatunków jeleniowatych jako żywicieli. Obserwacje te wskazują na dużą plastyczność w doborze żywicieli, na którą wpływ ma dostępność i gęstość populacji danego gatunku gospodarza. Z tego powodu nie ma oczywistych barier dla przyszłej ekspansji omawianych ektopasożytów (Andreani et al., 2020; Kurina et al., 2019).

Dostępne dane w GenBank wskazują, że sekwencje uzyskane w badaniach własnych były bardzo podobne do sekwencji pochodzących z Czech lub Litwy. Baza danych GenBank zawiera jednak tylko kilka sekwencji 16S rRNA europejskiej *L. fortisetosa*. Sekwencja MT182659, uzyskana w niniejszym badaniu, była najbardziej zbliżona do sekwencji pochodzącej z Japonii (AB632589) (Hosokawa et al., 2012). Sekwencja pozyskana została w gminie Pieniężno, gdzie od początku XX wieku istnieje stabilna populacja jeleni sika. *Lipoptena fortisetosa* mogła zostać przypadkowo wprowadzona do tego regionu wraz z introdukcją tych zwierząt. Podobne wnioski w odniesieniu do krajowych populacji *L. fortisetosa* sformułowali Andreani i in. (Andreani et al., 2020; Dittmar et al., 2006) oraz Mihalca i in. (Mihalca et al., 2019). Co ciekawe, we Włoszech wykryto dwa koreańskie haplotypy tego owada (Andreani et al., 2020). Polimorfizm genetyczny *L. fortisetosa* jest prawdopodobnie związany z segregacją haplotypów, które są stosunkowo popularne u tego gatunku, a stabilność populacji *L. fortisetosa* wskazuje na obecność dynamicznych mechanizmów ewolucyjnych.

Podobne poziomy różnorodności genetycznej odnotowano w badaniu przeprowadzonym na *L. mazamae* (Trout et al., 2010). Trout in. (2010) zidentyfikowali sześć unikalnych haplotypów przy użyciu 30 sekwencji DNA regionu 259 pz genu 16S rRNA. Takie różnice molekularne odnotowano również u innych pasożytów zewnętrznych, w tym *Cimex lectularius* (Linnaeus 1758), much tsetse (*Glossina* spp.) i kleszczy (Krafsur et al., 2000; Kulakova et al., 2014; Livanova et al., 2015; Szalanski et al., 2014). Szalanski i in. (Szalanski et al., 2014) zaobserwowali dużą różnorodność mitochondrialnego DNA z umiarkowanym lub wysokim poziomem przepływu genów u *C. lectularius*. Krafsur i in. (Krafsur et al., 2000) zidentyfikowali 26 haplotypów u much tsetse za pomocą markerów 12S rRNA i 16S rRNA, przy czym większość haplotypów wystąpiła tylko raz lub dwa razy. W tych samych lokalizacjach zidentyfikowano nawet sześć haplotypów (Krafsur et al., 2000).

Sekwencje genów 16S rRNA i COX1 są również użytecznymi markerami do analizy polimorfizmu genetycznego kleszczy oraz identyfikacji i różnicowania populacji *Dermacentor nuttalli (*Olenev, 1928*), Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930) i *I. pavlovskyi* (Pomerantsev, 1946) (Kulakova et al., 2014; Livanova et al., 2015). Odkrycia te wskazują, że gen 16S rRNA mitochondrialnego DNA można wykorzystać do badania genetyki populacji pasożytów zewnętrznych. Wcześniejsze odkrycia wykazały, że rodzaj *Lipoptena* spp. może być parafiletyczny; dlatego potrzebne są dalsze badania w celu zbadania zmienności genetycznej i taksonomii tego rodzaju (Petersen et al., 2007). Kurina i in. (2019) i Andreani i in. (Andreani et al., 2020) stwierdzili, że sekwencje COX1 *L. fortisetosa* zdeponowane w GenBank są zróżnicowane genetycznie i mają różne linie geograficzne w Europie. Podobne wnioski można sformułować na podstawie przedstawionych wyników badań.

Obecne badania ujawniły znaczne zróżnicowanie genetyczne *L. fortisetosa* na sześciu stanowiskach na Warmii i Mazurach, co wskazuje, że struktura genetyczna populacji tego owada jest znacznie bardziej złożona niż dotychczas sądzono. Możliwe, że kilka genetycznie odmiennych pierwotnych populacji prawdopodobnie migrowało lub zostało zawleczonych do Europy. Obecność progresywnych mechanizmów ewolucyjnych wskazuje na możliwość dalszej adaptacji *L. fortisetosa* do warunków środowiskowych Europy Środkowej. *Lipoptena fortisetosa* to gatunek inwazyjny, który silnie konkuruje o żywicieli z rodzimą populacją *L. cervi*, co może w przyszłości wpłynąć na wielkość obu populacji owadów. Potrzebne są dalsze analizy genetyczne strzyżaków, skonsolidowane z wykrywaniem patogenów, aby zidentyfikować obszary o potencjalnie wysokim ryzyku przenoszenia chorób zakaźnych przez *L. fortisetosa* (Trout et al., 2010). Struktura populacji strzyżaków powinna zostać przeanalizowana bardziej szczegółowo, aby odpowiednio zarządzać i chronić dzikie zwierzęta oraz monitorować przenoszenie patogenów nawet między odległymi regionami. Identyfikacje japońskiego haplotypu *Bartonella* spp. przez Szewczyk i in. (2017) i japońskiego haplotypu *L. fortisetosa* i Candidatus *Mycoplasma erythrocervae* w przedstawionych badaniach sugerują, w jaki sposób rozproszenie *Lipoptena* spp. w środowisku może przyczynić się do rozprzestrzeniania chorób zakaźnych przenoszonych przez te wektory.

Badania ujawniły dwa dominujące haplotypy *L. cervi* (MT337410 oraz MT337413) w Polsce. Te haplotypy znaleziono w prawie wszystkich badanych regionach. Niektóre sekwencje wykryto tylko w jednym województwie. Sugeruje to, że dwie dominujące sekwencje są najstarszymi sekwencjami, które dały początek lokalnie zidentyfikowanym haplotypom. Haplotypy te prawdopodobnie rozprzestrzeniły się w całej Polsce i wyewoluowały niezależnie, drogą doboru naturalnego, czego potwierdzeniem mogą być sekwencje uzyskane w niniejszych badaniach. Obserwacje te potwierdzają różnice w analizowanym genie. Ekspansja *L. cervi* jest nieograniczona w klimacie umiarkowanym (ze względu na potencjalną migrację jeleniowatych); dlatego populacja i różnorodność strzyżaków mogą być prawie identyczne w badanych lokalizacjach (pomimo poszczególnych mutacji). W przyszłości prawdopodobnie zostaną odkryte nowe haplotypy lokalne ze względu na niskie wskaźniki reprodukcji i ograniczenia siedliskowe wynikające z preferencji żywicieli (Trout et al., 2010). Należy również zauważyć, że zróżnicowanie genetyczne populacji *L. cervi* w Europie Środkowej sugeruje obecność wspólnych przodków i ciągłe migracje (przepływy genów) między krajami. Powyższe można również przypisać ograniczonej panmiksii, ponieważ rozmnażanie występuje tylko wśród osobników kolonizujących tego samego żywiciela. Obecność stabilnych populacji *L. cervi* na niektórych obszarach prawdopodobnie indukowała selekcję genetyczną, na którą miały wpływ czynniki środowiskowe i dostępność żywicieli. Powyższe sugeruje, że *L. cervi* łatwo przystosowuje się do nowych ekosystemów. Zaobserwowano bardzo bliskie podobieństwa między badanymi sekwencjami *L. cervi* a sekwencjami z Czech, Litwy i Polski zdeponowanymi w GenBank

(Nirmala et al., 2001; Radzijevskaja et al., 2020; Šochová et al., 2017; Szewczyk et al., 2017). Co ciekawe, nie wykazano podobieństwa z sekwencjami pozyskanymi z Niemiec i Danii (Dittmar et al., 2006; Petersen et al., 2007). Może to wskazywać na obecność genetycznie różnych populacji w Europie. Jednak może to też wynikać z tego, że tylko kilka sekwencji markerowych 16S badanego ektopasożyta jest dostępnych w GenBank.

Strzyżaki podobnie jak inne gatunki ektopasożytów charakteryzują się znacznym rozdrobnieniem populacji, co może prowadzić do izolacji i aberracji genetycznych. Z tego powodu uzasadnione wydaje się wykorzystanie genu 16S rRNA w analizach zróżnicowania genetycznego w ograniczonych populacjach. W przyszłości wyniki tego badania powinny zostać zweryfikowane poprzez analizę zmienności genetycznej genu oksydazy cytochromu c I (COX1) *L. cervi* w Polsce. Analiza korelacji między sekwencjami genów COX1 i 16S rRNA może również dostarczyć nowych informacji. Badania populacyjne wydają się być istotne, ponieważ *L. cervi* i *L. fortisetosa* są niedocenianymi wektorami chorób zakaźnych. Należy zauważyć, że rola tego owada z epidemiologicznego punktu widzenia nie jest w pełni zrozumiała. Dogłębna znajomość profilu genetycznego *Lipoptena* spp. w połączeniu z prewalencją chorób przenoszonych przez wektory pomogłyby w identyfikacji potencjalnych regionów wysokiego ryzyka. Potrzebne są dalsze badania ze względu na stały wzrost populacji strzyżaków. Obecność *Lipoptena* spp. na niespecyficznych żywicielach lub w niespecyficznych lokalizacjach (takich jak miasta) może również wskazywać, że owady te szybko asymilują się do nowych warunków środowiskowych. Powyższe stwierdzenie można skorelować z określonymi haplotypami, które lepiej przystosowują się do niespecyficznych ekosystemów. Procesy migracyjne mogą przyczynić się do rozprzestrzeniania się nowych patogenów na wcześniej nieskolonizowane obszary, w tym osiedla ludzkie. Można oczekiwać, że populacja *Lipoptena* spp. wzrośnie w Europie Środkowej z powodu zmian klimatycznych i wzrostu populacji żywicieli. W badanych regionach wysokie temperatury zimą i latem mogą potencjalnie zintensyfikować migrację tego gatunku ektopasożyta do osiedli ludzkich. Potrzebne są jednak dalsze badania, aby potwierdzić to założenie. Wyższe temperatury mogą znacząco wpłynąć na cykl rozwojowy opisywanych owadów poprzez skrócenie zimowej diapauzy, zmianę fenologii *Lipoptena* spp. i zwiększenie populacji ze względu na niższą śmiertelność w zimie. Stały wzrost pogłowia jeleni w Polsce zwiększa również dostępność żywicieli. Dlatego wzrost zagęszczenia populacji dzikich zwierząt kopytnych może również zmniejszyć śmiertelność związaną z brakiem żywicieli. Migracje jeleniowatych odgrywają istotną rolę w rozprzestrzenianiu się *Lipoptena* spp. Opisywane ektopasożyty mogą przetrwać na żywicielu ponad rok (Härkönen et al., 2010), dlatego nowa generacja może rozwijać się nawet w odległych lokalizacjach. Opisywane zjawisko może być też przyczyną występowania dwóch dominujących haplotypów. W przyszłości należy podjąć wysiłki w celu zbadania potencjalnej hybrydyzacji między tymi dwoma gatunkami strzyżaków. Ze względu na widoczne podobieństwa fizjologiczne i podobne wzorce aktywności *L. cervi* i *L. fortisetosa* (Oboňa et al., 2019) nieprawidłowa identyfikacja może dawać mylące wyniki w przyszłych badaniach.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że *L. fortisetosa* jest wszechobecna w analizowanych województwach. W poprzednim badaniu ten ektopasożyt został zidentyfikowany tylko w izolowanych lokalizacjach (Kowal et al., 2016). Strzyżaki mogły rozprzestrzenić się na nowe miejsca ze względu na niski poziom specyficzności w doborze żywiciela, a także poprzez migracje zwierząt. *Lipoptena fortisetosa* jest gatunkiem inwazyjnym w Polsce, ale jego populacja stale się powiększa, co sugeruje, że owad ten dobrze przystosował się do warunków środowiskowych Europy Środkowej. Dorosłe (skrzydlate) osobniki są odpowiedzialne za zdecydowaną większość infestacji niespecyficznych gospodarzy, w tym u ludzi (Maślanko et al., 2020), zwierząt towarzyszących (Sokół

& Gałęcki, 2017) i zwierząt gospodarskich (Metelitsa, 1989). Loty *L. fortisetosa* w poszukiwaniu gospodarzy mogą stanowić zagrożenie dla pracowników leśnych i myśliwych (Härkönen et al., 2009; Maślanko et al., 2020). Myśliwi mogą zostać zainfestowani przez *Lipoptena* spp. podczas patroszenia dzikich zwierząt. Psy myśliwskie mogą zostać zainfestowane przez te ektopasożyty podczas tropienia (Sokół & Gałęcki, 2017). Bydło i konie wypasane w sąsiedztwie lasów również mogą być zagrożone lotami *L. fortisetosa* (Dehio et al., 2004; Metelitsa, 1989). Najbardziej podatne na loty owadów są osoby noszące ciemne ubrania oraz zwierzęta o ciemnym futrze (Kortet et al., 2010).

Wykazano, że częstość występowania i liczba gatunków badanych patogenów były niższe u skrzydlatych owadów, niż u osobników pobranych od jeleniowatych. Ze względu na to, że strzyżaki odłamują sobie skrzydła po przyczepieniu się do żywiciela, każda późniejsza zmiana gospodarza jest utrudniona (Halkman, 1983). Jednak *Lipoptena* spp. może zmieniać żywicieli w okresie godowym jeleniowatych (Davis, 1973). Zainfestowane samice mogą również przenosić te ektopasożyty na swoje potomstwo (Samuel & Trainer, 1972). Patogeny mogą również zostać przeniesione, gdy owad zostanie zmiażdżony na skórze (Frischknecht, 2007). Przeprowadzone badania wskazują na obecność DNA patogenów u *L. fortisetosa*, które mogą być pobierane wraz z krwią oraz przenoszone podczas rozwoju embrionalnego larw. Materiał genetyczny *Babesia* spp., *Borrelia* spp. i *Theileria* spp. wykryto tylko u strzyżaków, które miały bezpośredni kontakt z jeleniowatymi. Jest to pierwsze badanie, w którym wykryto materiał genetyczny *Babesia* spp. u *L. fortisetosa*. Ponadto interesująca jest identyfikacja DNA *Borrelia* spp. u tych ektopasożytów pomimo tego, że jeleniowate są niekompetentnymi nosicielami tych bakterii (Jaenson & Tälleklint, 1992). Materiał genetyczny *Bartonella* spp., *Mycoplasma* spp. i *Rickettsia* spp. został dodatkowo zidentyfikowany u owadów skrzydlatych pobranych ze środowiska. Obecność skrzydeł oznacza, że osobniki te prawdopodobnie nie miały wcześniej kontaktu z gospodarzem (Haarløv, 1964). Należy zaznaczyć, że niektóre patogeny mogą być przenoszone przez wektory bez bezpośredniego kontaktu z gospodarzem (tzn. wertykalnie). Dlatego też, ze względu na charakterystyczny rozwój nowego pokolenia u *L. fortisetosa* zjawisko to jest jak najbardziej prawdopodobne.

Co ciekawe, analizowane owady były również nosicielami DNA *Coxiella* spp. i *Francisella tularensis*, a występowanie tych bakterii u strzyżaków zostało do tej pory słabo zbadane. Te gatunki bakterii zidentyfikowano w obu grupach owadów; jednak większość otrzymanych sekwencji zidentyfikowano jako endosymbionty. Ponadto, niniejsze odkrycia nie dostarczają wystarczających dowodów na poparcie powyższego twierdzenia, ponieważ zestaw do izolacji stosowany w tym badaniu jest przeznaczony do wykrywania śladowych ilości DNA. Możliwe jest, że poczwarki rozwijające się w podszyciu leśnym mogły zostać skontaminowane bakteriami pochodzenia środowiskowego. *Coxiella* spp. i *Francisella* spp. kolonizują glebę (Barns et al., 2005; Shabbir et al., 2016), a to właśnie na niej następuje przepoczwarczenie. Dodatkowo interesujące jest odnalezienie bakterii Candidatus *Mycoplasma erythrocervae*, która była najbliżej spokrewniona z izolatami z Japonii (Watanabe et al., 2010). Wariancja tego materiału genetycznego związanego z badanym fragmentem DNA jest niska, albo patogen został wprowadzony wraz z jeleniem sika (*Cervus nippon*). Możliwe, że wraz z wprowadzeniem tego gatunku do Polski patogen rozprzestrzenił się w populacji rodzimych jeleniowatych. Ewentualna obecność japońskiego haplotypu *Bartonella* spp. była sugerowana również w innych badaniach (Szewczyk et al., 2017).

Wykrycie materiału genetycznego patogenów za pomocą testów molekularnych może być ważnym aspektem w badaniach nad rolą *Lipoptena* spp. w przenoszeniu chorób zakaźnych. Badania te pozwalają na wstępne określenie potencjalnych patogenów, dla których *L. fortisetosa* może pełnić rolę wektora. Jednak trzeba zaznaczyć, że transmisję czynników zakaźnych przez *L. fortisetosa*

należy oceniać w oparciu o postulaty Kocha (Byrd & Segre, 2016; Evans, 1976; Gradmann, 2014). Na przykład ukończenie cyklu rozwojowego *Babesia* spp. oraz *Theileria* spp. u *Lipoptena* spp. wydaje się wątpliwe, ponieważ kleszcze są jedynymi znanymi żywicielami ostatecznymi tych pierwotniaków (Gray et al., 2019). Potrzebne są jednak dalsze badania, aby potwierdzić to założenie. Pomimo tego, strzyżaki mogą pełnić rolę mechanicznych wektorów dla tych patogenów (Bezerra-Santos & Otranto, 2020; Víchová et al., 2011). Sugeruje się, że *L. cervi* jest wektorem mechanicznym dla *A. phagocytophilum* (Buss et al., 2016; Víchová et al., 2011). Hornok i in. (Hornok et al., 2020) zidentyfikowali *Theileria* spp. u bolimuszki kleparki (*Stomoxys calcitrans* Linnaeus, 1758) i zasugerowali, że ten ektopasożyt może stwarzać ryzyko mechanicznego przenoszenia teleriozy. Dlatego w badaniach należy ocenić, czy podobne zjawisko może wystąpić u strzyżaków. *Lipoptena fortisetosa* może być potencjalnym wektorem biologicznym dla *Trypanosoma* spp. (Werszko et al., 2020). Obecnie *Bartonella* spp. jest najdokładniej zbadanym patogenem przenoszonym przez *Lipoptena* spp., który wydaje się stwarzać największe ryzyko przy infestacji tymi ektopasożytami (De Bruin et al., 2015; Korhonen et al., 2015; Songailaitė et al., 2018; Szewczyk et al., 2017). W niniejszym badaniu materiał genetyczny patogenów był częściej identyfikowany u samic *L. fortisetosa*, co można tłumaczyć faktem, że w przypadku niektórych gatunków ektopasożytów samice spożywają więcej pokarmu niż samce (Lehane, 2005; Yanovski & Ogston, 1982). Samice *Lipoptena* spp. prawdopodobnie muszą pobrać więcej krwi potrzebnej do embriogenezy i wewnątrzmacicznego karmienia larw (Mustonen et al., 2015). W badaniach wykryto prawdopodobną, wertykalną transmisję DNA wybranych mikroorganizmów. Niektóre patogeny były również bardziej rozpowszechnione w wybranych województwach. Różnice te można prawdopodobnie przypisać zmienności prewalencji patogenów w populacjach jeleniowatych (Kauffmann et al., 2017; Sawczuk et al., 2008). Obliczone wartości *V*-Cramera wskazują na brak istotnych powiązań między występowaniem badanych patogenów, co może sugerować, że inne wektory odgrywają istotniejszą rolę w transmisji opisywanych drobnoustrojów. W przyszłości strzyżaki mogą być wykorzystywane jako biologiczne markery chorób przenoszonych przez wektory w populacjach jeleniowatych, ze względu na biologię i behawior tych pasożytów zewnętrznych oraz specyficzne relacje ektopasożyt – żywiciel. Pozyskiwanie materiału biologicznego – w szczególności krwi – nadającego się do analiz molekularnych może być problematyczne, jeśli nie jest dostępny odpowiedni sprzęt oraz zaplecze transportowe i analityczne. Niniejsze badania wykazały, że DNA patogenów można łatwo zidentyfikować u strzyżaków. Jednak potrzebne są dalsze badania, aby potwierdzić, czy żywotne patogeny są rzeczywiście obecne, a jeśli tak, to czy mogą być przenoszone przez *Lipoptena* spp. Doświadczenia przeprowadzone na zwierzętach laboratoryjnych, których nie wykonano do tej pory, wyjaśniłyby rolę tych owadów jako potencjalnych wektorów chorób zakaźnych. Przyszłe badania powinny koncentrować się na metodach kontrolowania tych ektopasożytów oraz ochrony ludzi i zwierząt przed ich atakami. Większą uwagę należy również zwrócić na obecność *L. fortisetosa* w Europie Środkowej, ponieważ jej wpływ na rodzime populacje jeleniowatych pozostaje w dużej mierze nieznany. Strzyżaki powinny być kategoryzowane jako szkodniki w gospodarce łowieckiej i leśnej, ponieważ mogą one wpływać negatywnie na zwierzynę płową i mogą uprzykrać hodowlę i pozyskiwanie zwierzyny dzikiej.

8. Aspekt wdrożeniowy

8.1. Zastosowanie strzyżaków jako biologicznych markerów chorób przenoszonych przez wektory u jeleniowatych

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie strzyżaków do diagnostyki patogenów przenoszonych przez wektory w populacjach jeleniowatych. Pozwala to na określenie prewalencji

chorób przenoszonych przez wektory u wspomnianych zwierząt za pomocą standardowych badań molekularnych. Strzyżaki można wykorzystać jako biologiczne markery do oceny epidemiologicznej.

Przeprowadzone badania wskazują, że u strzyżaków pozyskanych od zwierząt wykrywany jest materiał genetyczny patogenów specyficznych dla dzikich zwierząt. W trakcie badań własnych w organizmie strzyżaków pozyskanych z ciał jeleniowatych wykryto materiał genetyczny *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Borellia* spp., *Coxiella* spp., *Francisiella tularensis*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia* spp. i *Theileria* spp. Należy przy tym zaznaczyć, że zwykle od poszczególnych zwierząt pozyskiwano pojedyncze osobniki muchówek. Istotnym jest również fakt, że nikt nie powiązał obecności materiału genetycznego patogenów w strzyżakach z prewalencją/monitoringiem patogenów przenoszonych przez wektory w populacjach zwierzyny dzikiej.

Na podstawie powyższych informacji zaproponowane zostało postępowanie, w którym strzyżaki stosuje się jako alternatywny marker/dodatkowy materiał biologiczny, przy pomocy, którego określać można prewalencje chorób przenoszonych przez wektory w populacjach dzikich jeleniowatych. Istotą wynalazku jest zastosowanie strzyżaków jako biologicznych markerów chorób przenoszonych przez wektory u jeleniowatych. Zastosowanie ektopasożytniczej muchówki *L. cervi* i *L. fortisetosa* pozwala na wykrycie patogenów, przenoszonych przez wektory występujących u dzikich przeżuwaczy. Przyjęto, że wspomniane owady stanowią alternatywny materiał biologiczny, który może zostać zastosowany w badaniach laboratoryjnych.

8.2. Pojemniki do przetrzymywania i transportu ektopasożytów, zwłaszcza muchówek z rodziny Hippoboscidae ze środowiska naturalnego

Przedmiotem wynalazku opracowanego w trakcie prowadzonych badań są pojemniki do przetrzymywania i transportu ektopasożytów, zwłaszcza muchówek z rodziny Hippoboscidae ze środowiska naturalnego do celów badawczych w medycynie weterynaryjnej, entomologii, parazytologii, badaniach środowiskowych, diagnostyce laboratoryjnej i zoologii.

Pomimo wysokiej odporności na warunki środowiskowe, wiele gatunków wchodzących w skład tej rodziny nie przetrwa bez pożywienia. Skutkuje to utrudnionym transportem żywych owadów do laboratorium w celu zbadania ich behawioru czy założenia hodowli laboratoryjnej. Średni czas przeżywalności tych owadów bez dodatkowych zabiegów protekcyjnych wynosi 2 - 6 h w zależności od temperatury. Z uwagi, że muchówki te, żyją czasem w ciężko dostępnych biotopach, śmiertelność wśród pozyskanych owadów może być wysoka. Problematyczne staje się też przewiezienie owadów do laboratorium z odległych terenów.

W ramach realizowanych prac naukowych opracowano pojemniki, które pozwalają na nieinwazyjne przenoszenie żywych owadów do laboratorium czy hodowli. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji wynika, że można przedłużyć żywotność muchówek z rodziny narzępikowatych nawet do 96 h. Obserwację przeprowadzono na przykładzie gatunków *L. cervi* i *L. fortisetosa*.

Według wynalazku pojemniki do przetrzymywania i transportu ektopasożytów, zwłaszcza muchówek z rodziny Hippoboscidae ze środowiska naturalnego charakteryzują się tym, że zakrętka pojemnika posiada co najmniej jeden otwór powietrzny o wielkości od 0,5 mm, a w środku posiada materiał sorpcyjny nasączony antykoagulantem, na który naniesiona jest krew ssaka lub ptaka. Stężenie antykoagulantu we krwi wynosi od 0,001 mg/ml do 1000 mg/ml. Jako antykoagulant zastosować można: K2 lub K3 EDTA, heparynę, fluorek sodu, szczawian potasu lub octan jodu. Wykorzystać można krew, która została pobrana do standardowo stosowanych probówek do morfologii.

Jest to rozwiązanie pozwalające na wydłużenie czasu życia muchówek utrzymywanych w warunkach sztucznych. Opisywana technika jest szczególnie skuteczna wobec gatunków z rodzaju *Hippobosca* spp. i *Lipoptena* spp. Pojemnik daje możliwość sztucznego karmienia ektopasożytów, a przez to zwiększa przeżywalność pozyskanych osobników. Pojemniki transportowe mogą być wykorzystywane także do utrzymywania owadów np. w laboratorium.

9. Podsumowanie

Znaczenie *Lipoptena* spp. w medycynie weterynaryjnej nie zostało w pełni poznane, dlatego te ektopasożyty należało zbadać bardziej szczegółowo. Istniejąca wiedza na temat wpływu *L. fortisetosa* na dzikie zwierzęta jest powierzchowna, a te ektopasożyty mogą w przyszłości wpłynąć na zarządzanie zwierzyną łowną. Stwierdzono, że polskie jeleniowate były silnie zainfestowane strzyżakami (Kadulski, 1996; Kadulski, 1998; Szczurek & Kadulski, 2004). Andreani i in. (Andreani et al., 2020; Andreani et al., 2019) wykryli inwazję europejskich gatunków jeleni przez *L. fortisetosa*. Stabilność populacji *L. fortisetosa* na nowych terenach można przypisać adaptacyjnej zmienności genetycznej i korzyściom związanym z kolonizacją różnych gatunków jeleniowatych jako żywicieli. Obserwacje te wskazują na dużą plastyczność w doborze żywicieli, na którą wpływ ma dostępność i gęstość populacji danego gatunku żywiciela. Z tego powodu nie ma oczywistych barier dla przyszłej ekspansji omawianych ektopasożytów (Andreani et al., 2020; Kurina et al., 2019).

Wyniki przedstawionych badań dostarczają dodatkowych dowodów na to, że populacje *L. fortisetosa* w Europie Środkowej mają różne linie genetyczne. Szczegółowa charakterystyka genetyczna strzyżaków w Europie Środkowej umożliwia śledzenie i przewidywanie rozprzestrzeniania się *L. fortisetosa*. Migracje na nowe obszary powinny zachęcać do nowych badań nad dynamiką i genetyką populacji *L. fortisetosa*, ponieważ według Kurina i in. (Kurina et al., 2019) gruntowne zrozumienie rozmieszczenia i bionomii tego inwazyjnego gatunku wędrownego ma kluczowe znaczenie dla jego skutecznej kontroli w Europie. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że *L. fortisetosa* utworzyły stabilne i zróżnicowane genetycznie populacje w całej Polsce. Genetyka populacji *L. fortisetosa* powinna być dalej badana w celu śledzenia migracji tych ektopasożytów do Europy Północnej i Zachodniej. Potrzebne są dalsze badania, aby wykryć nowe lokalizacje i przeanalizować linie genetyczne *L. fortisetosa*. Sekwencje zidentyfikowane w tych badaniach 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 zidentyfikowano w innych krajach Europy Środkowej, a lokalne haplotypy wykryto 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. W przyszłości genetyka populacji *L. cervi* powinna zostać zbadana bardziej szczegółowo, aby przyczynić się do rozwoju programów prewencyjnych mających na celu zmniejszenie populacji tych pasożytów zewnętrznych w środowisku i zminimalizowanie negatywnego wpływu strzyżaków na dzikie zwierzęta, zwierzęta gospodarskie i ludzi.

W analizowanych próbkach *L. fortisetosa*, pozyskanych od zwierząt i ze środowiska, znajdował się materiał genetyczny *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Borellia* spp., *Coxiella*-like endosymbionts, *F. tularensis*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia* spp., oraz *Theileria* spp. Strzyżaki mogą być używane jako markery biologiczne do identyfikacji patogenów w populacjach jeleniowatych, ale potrzebne są dalsze badania, aby potwierdzić to założenie. Przyszłe badania mogą ujawnić

kompetencje *L. fortisetosa* jako wektora biologicznego lub mechanicznego. Rola *L. fortisetosa* jako wektora patogenów wymaga dalszych, bardziej rozległych badań ze względu na ich nowe miejsca kolonizacji oraz ataki na ludzi i zwierzęta. Istotnym jest, aby badania te spełniły założenia postulatów Kocha. Są to ważne kwestie, które wymagają dalszej uwagi.

10. Wnioski

1) Populacja *L. fortisetosa* występuje na terytorium całej Polski, dlatego też te owady powinny uznane za szkodniki w gospodarce łowieckiej i leśnej.
2) Liczebność populacji *L. fortisetosa* prawdopodobnie wzrośnie w przyszłości. Można się również spodziewać, że gatunek ten będzie kolonizował nowe ekosystemy, zarówno ze względu na zmiany klimatyczne, jak i migrację dzikich przeżuwaczy na tereny antropogeniczne.
3) Przeprowadzone badania potwierdziły występowanie korelacji między czynnikami czasowo-mikroklimatycznymi a liczbą muchówek poszukających nowych żywicieli. Stwierdzono silną korelacje między temperaturą a liczebnością muchówek. Istotnym czynnikiem był również dzień pomiaru, ale był on znacznie słabiej skorelowany z liczbą zebranych strzyżaków niż temperatura. Podobną korelacje zaobserwowano między liczebnością *L. fortisetosa* a wilgotnością. Podczas badań terenowych zaobserwowano nieznaczny spadek liczby pobranych ektopasożytów, co może wskazywać na brak nowych pokoleń tych owadów. Rozkład płci nie był skorelowany z czasem pomiarów.
4) Obecność *L. fortisetosa* w bardzo zróżnicowanych ekosystemach sugeruje, że gatunek ten może być określony jako eurytopowy.
5) Autochtoniczny gatunek *L. cervi* stanowił 79,88% pobranych próbek, co sugeruje, że jest to gatunek dominujący w regionie Warmii i Mazur. Ze względu na różnice fenologiczne między gatunkami, na liczbę zebranych osobników może mieć również wpływ sezon pobierania próbek, co więcej prezentowane badania potwierdziły, że dorosłe osobniki *L. fortisetosa* i *L. cervi* są aktywne w tym samym czasie.
6) Polimorfizm genetyczny *L. fortisetosa* jest prawdopodobnie związany z segregacją haplotypów, które są stosunkowo popularne u tego gatunku, a stabilność populacji *L. fortisetosa* wskazuje na obecność dynamicznych mechanizmów ewolucyjnych.
7) Dostępne dane w GenBank wskazują, że sekwencje genu 16S rRNA uzyskane w badaniach własnych od *L. fortisetosa* były bardzo podobne do sekwencji pochodzących z Czech lub Litwy.
8) Sekwencja genu 16S rRNA *L. fortisetosa* MT182659, uzyskana w opisywanych badaniach, była najbardziej zbliżona do sekwencji DNA pochodzącej z Japonii (AB632589), co oznacza, że gatunek te mógł zostać zawleczony wraz z jeleniami sika.
9) Wyniki przedstawionych badań dostarczają dodatkowych dowodów na to, że populacja *L. fortisetosa* w Europie Środkowej posiada różne linie genetyczne.
10) Potwierdzenie materiału genetycznego patogenów sugeruje, że *L. fortisetosa* może być potencjalnym wektorem chorób zakaźnych.
11) Bakteria Candidatus *Mycoplasma erythrocervae*, która była najbliżej spokrewniona z izolatami pochodzącymi z Japonii, została prawdopodobnie zawleczona wraz z importowanymi zwierzętami.
12) Materiał genetyczny patogenów jest częściej identyfikowany u samic *L. fortisetosa.*
13) Prewalencja i liczba gatunków badanych patogenów jest niższa u skrzydlatych owadów, niż u osobników pobranych od jeleniowatych.
14) Zasięg geograficzny tych ektopasożytów mógł być poszerzony przez naturalną migrację tych owadów ze wschodu. Nie można wykluczyć, że *L. fortisetosa* mogła być przywieziona do Europy wraz z importowanymi zwierzętami znacznie wcześniej niż sądzono.
15) Aby podkreślić charakter inwazyjny opisywanego gatunku, propozycja polskiej nazwy zwyczajowej dla *L. fortisetosa* to strzyżak azjatycki.

11.Literatura

1. Aguirre, A. A., Hansen, D. E., Starkey, E. E., & McLean, R. G. (1995). Serologic survey of wild cervids for potential disease agents in selected national parks in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*, *21*(4), 313-322.
2. Andreani, A., Giangaspero, A., Marangi, M., Barlaam, A., Ponzetta, M. P., Roy, L., Belcari, A., & Sacchetti, P. (2020). Asia and Europe: So Distant So Close? The Case of *Lipoptena fortisetosa* in Italy. *The Korean Journal of Parasitology*, *58*(6), 661.
3. Andreani, A., Sacchetti, P., & Belcari, A. (2019). Comparative morphology of the deer ked *Lipoptena fortisetosa* first recorded from Italy. *Medical and Meterinary Entomology*, *33*(1), 140-153.
4. Astobiza, I., Barral, M., Ruiz-Fons, F., Barandika, J., Gerrikagoitia, X., Hurtado, A., & García-Pérez, A. (2011). Molecular investigation of the occurrence of *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. *Veterinary Microbiology*, *147*(1-2), 190-194.
5. Aussenac, G. (2000). Interactions between forest stands and microclimate: ecophysiological aspects and consequences for silviculture. *Annals of Forest Science*, *57*(3), 287-301.
6. Baker, J. (1967). A review of the role played by the Hippoboscidae (Diptera) as vectors of endoparasites. *The Journal of Parasitology*, 412-418.
7. Bakhtushkina, A. (2018). Survivability of *Lipoptena cervi* imaginal forms (Diptera, Hippoboscidae). *Rossiĭskiĭ Parazitologicheskiĭ Zhurnal*(3), 23-26.
8. Baldacchino, F., Desquesnes, M., Mihok, S., Foil, L. D., Duvallet, G., & Jittapalapong, S. (2014). Tabanids: neglected subjects of research, but important vectors of disease agents! *Infection, Genetics and Evolution*, *28*, 596-615.
9. Barbour, A. G., Maupin, G. O., Teltow, G. J., Carter, C. J., & Piesman, J. (1996). Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: possible agent of a Lyme disease-like illness. *Journal of Infectious Diseases*, *173*(2), 403-409.
10. Barns, S. M., Grow, C. C., Okinaka, R. T., Keim, P., & Kuske, C. R. (2005). Detection of diverse new *Francisella*-like bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(9), 5494-5500.
11. Benelli, G., & Duggan, M. F. (2018). Management of arthropod vector data–Social and ecological dynamics facing the One Health perspective. *Acta Tropica*, *182*, 80-91.
12. Bezerra-Santos, M. A., & Otranto, D. (2020). Keds, the enigmatic flies and their role as vectors of pathogens. *Acta Tropica*, *209*, 105521.
13. Bohlman, S. A., Matelson, T. J., & Nadkarni, N. M. (1995). Moisture and temperature patterns of canopy humus and forest floor soil of a montane cloud forest, Costa Rica. *Biotropica*, 13-19.
14. Borowiec, L. (1984). Czesc XXVIII Muchówki—Diptera. Zeszyt 77 Wpleszczowate—Hippoboscidae. *Klucze do Oznaczania Owadów Polski; PWN: Warszawa, Poland*, 3-35.
15. Borowiec, L., & Zatwarnicki, T. (1989). *Lipoptena fortisetosa* Maa, 1965 (Diptera, Hippoboscidae), nowy gatunek dla fauny Polski. *Przegląd Zoologiczny*, *33*(4).
16. Böse, R., & Petersen, K. (1991). *Lipoptena cervi* (Diptera), a potential vector of Megatrypanum trypanosomes of deer (Cervidae). *Parasitology Research*, *77*, 723-725.
17. Bourque, M., & Higgins, R. (1984). Serologic studies on brucellosis, leptospirosis and tularemia in moose (*Alces alces*) in Quebec. *Journal of Wildlife Diseases*, *20*(2), 95-99.
18. Bown, K. J., Lambin, X., Ogden, N. H., Petrovec, M., Shaw, S. E., Woldehiwet, Z., & Birtles, R. J. (2007). High-resolution genetic fingerprinting of European strains of *Anaplasma phagocytophilum* by use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(6), 1771-1776.
19. Brückner, A. (1926). *Słownik etymologiczny języka polskiego*. Nakładem Krakowskiej spółki wydawniczej.

20. Bruno, P., Bruno, G., & Claudine, P.-E. (2000). Detection of spirochaetes of *Borrelia burgdorferi* complexe in the skin of cervids by PCR and culture. *European Journal of Epidemiology*, *16*, 869-873.
21. Bueno-Marí, R., & Jiménez-Peydró, R. (2011). *Anopheles plumbeus* Stephens, 1828: a neglected malaria vector in Europe. *Malaria Reports*, *1*(1), e2-e2.
22. Buss, M., Case, L., Kearney, B., Coleman, C., & Henning, J. (2016). Detection of Lyme disease and anaplasmosis pathogens via PCR in Pennsylvania deer ked. *Journal of Vector Ecology*, *41*(2), 292-294.
23. Byrd, A. L., & Segre, J. A. (2016). Adapting Koch's postulates. *Science*, *351*(6270), 224-226.
24. Chen, J., Saunders, S. C., Crow, T. R., Naiman, R. J., Brosofske, K. D., Mroz, G. D., Brookshire, B. L., & Franklin, J. F. (1999). Microclimate in forest ecosystem and landscape ecology: variations in local climate can be used to monitor and compare the effects of different management regimes. *BioScience*, *49*(4), 288-297.
25. Christidis, N., Jones, G. S., & Stott, P. A. (2015). Dramatically increasing chance of extremely hot summers since the 2003 European heatwave. *Nature Climate Change*, *5*(1), 46-50.
26. Cowan, I. M. (1943). Notes on the life history and morphology of *Cephenemyia jellisoni* Townsend and *Lipoptena depressa* Say, two dipterous parasites of the Columbian black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus* (Richardson)). *Canadian Journal of Research*, *21*(6), 171-187.
27. Cowan, I. M. (1946). Parasites, diseases, injuries, and anomalies of the Columbian black-tailed deer, *Odocoileus hemionus columbianus* (Richardson), in British Columbia. *Canadian Journal of Research*, *24*(2), 71-103.
28. Cydzik, K., & Kadulski, S. (2009). Parasitic insects of the red deer (*Cervus elaphus* L.) in the Northern Poland. Stawonogi: inwazje i ich ograniczanie, 2009, Lublin, Akapit, ISBN 978-83-896168-6-9
29. Danks, H. V. (1987). *Insect dormancy: an ecological perspective*. Biological Survey of Canada (Terrestrial Arthropods). National Museum of Natural Sciences, Ottawa, Canada.
30. Davis, J. W. (1973). Deer ked infestation on white-tailed deer in East Texas. *The Journal of Wildlife Management*, 183-186.
31. De Bruin, A., Van Leeuwen, A. D., Jahfari, S., Takken, W., Földvári, M., Dremmel, L., Sprong, H., & Földvári, G. (2015). Vertical transmission of *Bartonella schoenbuchensis* in *Lipoptena cervi*. *Parasites & Vectors*, *8*(1), 1-6.
32. Decastello, A., & Farkas, R. (2010). Anaphylactic reaction following forest fly (*Hippobosca equina*) bite: A human case. *Clinical and Experimental Medical Journal*, *4*(1), 193-198.
33. Dehio, C., Lanz, C., Pohl, R., Behrens, P., Bermond, D., Piémont, Y., Pelz, K., & Sander, A. (2001). *Bartonella schoenbuchii* sp. nov., isolated from the blood of wild roe deer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *51*(4), 1557-1565.
34. Dehio, C., Sauder, U., & Hiestand, R. (2004). Isolation of *Bartonella schoenbuchensis* from *Lipoptena cervi*, a blood-sucking arthropod causing deer ked dermatitis. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(11), 5320-5323.
35. Dittmar, K., Porter, M. L., Murray, S., & Whiting, M. F. (2006). Molecular phylogenetic analysis of nycteribiid and streblid bat flies (Diptera: Brachycera, Calyptratae): implications for host associations and phylogeographic origins. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *38*(1), 155-170.
36. Doby, J., Bigaignon, G., Degeilh, B., & Guiguen, C. (1994). Ectoparasites of large wild mammals (deer and wild boars) and Lyme borreliosis. Search for *Borrelia burgdorferi* in more than 1400 ticks, lice, Pupipara Diptera and fleas. *Revue de Médecine Vétérinaire*, *145*(10), 743-748.
37. Elfving, K., Malmsten, J., Dalin, A.-M., & Nilsson, K. (2015). Serologic and molecular prevalence of *Rickettsia helvetica* and A*naplasma phagocytophilum* in wild cervids and domestic mammals in the central parts of Sweden. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *15*(9), 529-534.

38. Evans, A. S. (1976). Causation and disease: the Henle-Koch postulates revisited. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, *49*(2), 175.
39. Frischknecht, F. (2007). The skin as interface in the transmission of arthropod-borne pathogens. *Cellular Microbiology*, *9*(7), 1630-1640.
40. Gałęcki, R., Xuan, X., & Bakuła, T. (2022). Migration of deer keds to urban agglomerations – a case study. *Annals of Parasitology 68*(2), 232.
41. Ginsberg, H. S., & Ewing, C. P. (1989). Comparison of flagging, walking, trapping, and collecting from hosts as sampling methods for northern deer ticks, *Ixodes dammini*, and lone-star ticks, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *Experimental & Applied Acarology*, *7*, 313-322.
42. Gothe, R., & Schöl, H. (1994). Deer keds (*Lipoptena cervi*) in the accompanying equipment of the late Neolithic human mummy from the Similaun, South Tyrol. *Parasitology Research*, *80*, 81-83.
43. Gradmann, C. (2014). A spirit of scientific rigour: Koch's postulates in twentieth-century medicine. *Microbes and Infection*, *16*(11), 885-892.
44. Gray, J. S., Estrada-Peña, A., & Zintl, A. (2019). Vectors of babesiosis. *Annual Review of Entomology*, *64*, 149-165.
45. Grazziotin, A. L., Duarte, J. M. B., Szabó, M. P. J., Santos, A. P., Guimarães, A. M. S., Mohamed, A., Vieira, R. F. d. C., de Barros Filho, I. R., Biondo, A. W., & Messick, J. B. (2011). Prevalence and molecular characterization of *Mycoplasma ovis* in selected free-ranging Brazilian deer populations. *Journal of Wildlife Diseases*, *47*(4), 1005-1011.
46. Grazziotin, A. L., Santos, A. P., Guimaraes, A. M. S., Mohamed, A., Cubas, Z. S., De Oliveira, M. J., Dos Santos, L. C., De Moraes, W., da Costa Vieira, R. F., & Donatti, L. (2011). *Mycoplasma ovis* in captive cervids: prevalence, molecular characterization and phylogeny. *Veterinary Microbiology*, *152*(3-4), 415-419.
47. Haarløv, N. (1964). Life cycle and distribution pattern of *Lipoptena cervi* (L.)(Dipt., Hippobosc.) on Danish deer. *Oikos*, *15*(1), 93-129.
48. Hackman, W. (1979). The colonization of Finland by the deer ked, *Lipoptena cervi* L.(Dipt., Hippoboscidae). *Entomologisk Tidskrift (Sweden)*, *100*(3-4), 209-210.
49. Hagemoen, R. I. M., & Reimers, E. (2002). Reindeer summer activity pattern in relation to weather and insect harassment. *Journal of Animal Ecology*, *71*(5), 883-892.
50. Halkman, W. (1983). Immigration of *Lipoptera cervi* (Diptera, Hippoboscidae) in Finland, with notes on its biology and medical significance. *Notulae entomologicae*, *63*(2), 53-59.
51. Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, *41*, 95-98.
52. Hansford, K. M., Carter, D., Gillingham, E. L., Hernandez-Triana, L. M., Chamberlain, J., Cull, B., McGinley, L., Phipps, L. P., & Medlock, J. M. (2019). *Hyalomma rufipes* on an untraveled horse: Is this the first evidence of *Hyalomma* nymphs successfully moulting in the United Kingdom? *Ticks and Tick-borne Diseases*, *10*(3), 704-708.
53. Härkönen, L., Härkönen, S., Kaitala, A., Kaunisto, S., Kortet, R., Laaksonen, S., & Ylönen, H. (2010). Predicting range expansion of an ectoparasite–the effect of spring and summer temperatures on deer ked *Lipoptena cervi* (Diptera: Hippoboscidae) performance along a latitudinal gradient. *Ecography*, *33*(5), 906-912.
54. Härkönen, L., & Kaitala, A. (2013). Months of asynchrony in offspring production but synchronous adult emergence: the role of diapause in an ectoparasite's life cycle. *Environmental Entomology*, *42*(6), 1408-1414.
55. Härkönen, L., Kaitala, A., Kaunisto, S., & Repo, T. (2012). High cold tolerance through four seasons and all free-living stages in an ectoparasite. *Parasitology*, *139*(7), 926-933.
56. Härkönen, S., Laine, M., Vornanen, M., & Reunala, T. (2009). Deer ked (*Lipoptena cervi*) dermatitis in humans–an increasing nuisance in Finland. *Alces: A Journal Devoted to the Biology and Management of Moose*, *45*, 73-79.

57. Hilpertshauser, H., Deplazes, P., Schnyder, M., Gern, L., & Mathis, A. (2006). *Babesia* spp. identified by PCR in ticks collected from domestic and wild ruminants in southern Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(10), 6503-6507.
58. Hodek, I., & Hodková, M. (1988). Multiple role of temperature during insect diapause: a review. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *49*(1-2), 153-165.
59. Hornok, S., de la Fuente, J., Biró, N., Fernández de Mera, I. G., Meli, M. L., Elek, V., Gönczi, E., Meili, T., Tánczos, B., & Farkas, R. (2011). First molecular evidence of *Anaplasma ovis* and *Rickettsia* spp. in keds (Diptera: Hippoboscidae) of sheep and wild ruminants. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *11*(10), 1319-1321.
60. Hornok, S., Takács, N., Szekeres, S., Szőke, K., Kontschán, J., Horváth, G., & Sugár, L. (2020). DNA of T*heileria orientalis*, *T. equi* and *T. capreoli* in stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *Parasites & Vectors*, *13*, 1-6.
61. Hosokawa, T., Nikoh, N., Koga, R., Satô, M., Tanahashi, M., Meng, X.-Y., & Fukatsu, T. (2012). Reductive genome evolution, host–symbiont co-speciation and uterine transmission of endosymbiotic bacteria in bat flies. *The ISME journal*, *6*(3), 577-587.
62. Hoy, A., Feske, N., Štěpánek, P., Skalák, P., Schmitt, A., & Schneider, P. (2018). Climatic Changes and Their Relation to Weather Types in a Transboundary Mountainous Region in Central Europe. *Sustainability*, *10*(6), 2049.
63. Hulinska, D., Votypka, J., Plch, J., Vlcek, E., Valesova, M., Bojar, M., Hulinsky, V., Smetana, K. (2002). Molecular and microscopical evidence of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in patients, animals and ticks in the Czech Republic. *New Microbiologica, 25*, 437–448.
64. Inokuma, H., Seino, N., Suzuki, M., Kaji, K., Takahashi, H., Igota, H., & Inoue, S. (2008). Detection of *Rickettsia helvetica* DNA from peripheral blood of sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Japan. *Journal of Wildlife Diseases*, *44*(1), 164-167.
65. Izdebska, J. (2001). European bison arthropod parasites from closed Polish breeding facilities. *Acta Parasitologica*, *46*(2).
66. Jaenson, T. G., & Tälleklint, L. (1992). Incompetence of roe deer as reservoirs of the Lyme borreliosis spirochete. *Journal of Medical Entomology*, *29*(5), 813-817.
67. Jensen, W. A., Fall, M. Z., Rooney, J., Kordick, D. L., & Breitschwerdt, E. B. (2000). Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(5), 1717-1722.
68. Jędrysik, D., & Kadulski, S. (2012). Parasitic arthropods of roe deer *Capreolus capreolus* (L.) of the region of Pojezierza Południowobałtyckie (The Southern Baltic Lake District). Stawonogi: znaczenie medyczne i gospodarcze, 2012, Lublin, Akapit, 367 s., ISBN 978-83-896162-1-0
69. Kadulski, S. (1989). Występowanie stawonogów pasożytniczych na łownych Lagomorpha i Artiodactyla Polski–próba syntezy [The occurrence of parasitic arthropods on the game Lagomorpha and Artiodactyla of Poland–a trial synthesis]. Uniw. Gdański. *Zeszyty Naukowe*, *132*.
70. Kadulski, S. (1996). Ectoparasites of Cervidae in north-east Poland. *Acta Parasitologica*, *4*(41).
71. Kadulski, S. (1998). *Lipoptena* Nitzsch, 1818 in Poland. *Wiadomości Parazytologiczne*, *44*(3).
72. Kauffmann, M., Rehbein, S., Hamel, D., Lutz, W., Heddergott, M., Pfister, K., & Silaghi, C. (2017). *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. in roe deer (*Capreolus capreolus*), fallow deer (*Dama dama*) and mouflon (*Ovis musimon*) in Germany. *Molecular and Cellular Probes*, *31*, 46-54.
73. Kaunisto, S., Härkönen, L., Niemelä, P., Roininen, H., & Ylönen, H. (2011). Northward invasion of the parasitic deer ked (*Lipoptena cervi*), is there geographical variation in pupal size and development duration? *Parasitology*, *138*(3), 354-363.
74. Klei, T. R., & Degiusti, D. L. (1975). Observations on the bionomics of *Pseudolynchia canariensis* (Diptera: Hippoboscidae). *Parasitology*, *70*(2), 195-202.

75. Korhonen, E., Vera, C. P., Pulliainen, A., Sironen, T., Aaltonen, K., Kortet, R., Härkönen, L., Härkönen, S., Paakkonen, T., & Nieminen, P. (2015). Molecular detection of *Bartonella* spp. in deer ked pupae, adult keds and moose blood in Finland. *Epidemiology & Infection*, *143*(3), 578-585.
76. Kortet, R., Härkönen, L., Hokkanen, P., Härkönen, S., Kaitala, A., Kaunisto, S., Laaksonen, S., Kekäläinen, J., & Ylönen, H. (2010). Experiments on the ectoparasitic deer ked that often attacks humans; preferences for body parts, colour and temperature. *Bulletin of Entomological Research*, *100*(3), 279-285.
77. Kowal, J., Nosal, P., Kornaś, S., Wajdzik, M., Matysek, M., & Basiaga, M. (2016). Biodiversity and importance of hippoboscids infection in cervids. *Medycyna Weterynaryjna*, *72*(12), 745-749.
78. Kowal, J., Nosal, P., Rościszewska, M., & Matysek, M. (2009). New records of *Lipoptena fortisetosa* Maa, 1965 (Diptera: Hippoboscidae) in Poland. *Dipteron*, *25*, 27-29.
79. Krafsur, E., Madsen, M., Wohlford, D., Mihok, S., & Griffiths, N. (2000). Population genetics of *Glossina morsitans submorsitans* (Diptera: Glossinidae). *Bulletin of Entomological Research*, *90*(4), 329-335.
80. Kulakova, N. V., Khasnatinov, M. A., Sidorova, E. A., Adelshin, R. V., & Belikov, S. I. (2014). Molecular identification and phylogeny of *Dermacentor nuttalli* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, *113*, 1787-1793.
81. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547.
82. Kurina, O., Kirik, H., Õunap, H., & Õunap, E. (2019). The northernmost record of a blood-sucking ectoparasite, *Lipoptena fortisetosa* Maa (Diptera: Hippoboscidae), in Estonia. *Biodiversity Data Journal*, *7*.
83. Labruna, M. B., Whitworth, T., Horta, M. C., Bouyer, D. H., McBride, J. W., Pinter, A., Popov, V., Gennari, S. M., & Walker, D. H. (2004). *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(1), 90-98.
84. Lane, R. S., Mun, J., Parker, J. M., & White, M. (2005). Columbian black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*) as hosts for *Borrelia* spp. in northern California. *Journal of Wildlife Diseases*, *41*(1), 115-125.
85. Larrieu, L., Paillet, Y., Winter, S., Bütler, R., Kraus, D., Krumm, F., Lachat, T., Michel, A. K., Regnery, B., & Vandekerkhove, K. (2018). Tree related microhabitats in temperate and Mediterranean European forests: A hierarchical typology for inventory standardization. *Ecological Indicators*, *84*, 194-207.
86. Laukkanen, A., Ruoppi, P., & Mäkinen-Kiljunen, S. (2005). Deer ked-induced occupational allergic rhinoconjunctivitis. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, *94*(5), 604-608.
87. Lee, S.-H., Kim, K.-T., Kwon, O.-D., Ock, Y., Kim, T., Choi, D., & Kwak, D. (2016). Novel detection of *Coxiella* spp., *Theileria luwenshuni*, and *T. ovis* endosymbionts in deer keds (*Lipoptena fortisetosa*). *PLoS One*, *11*(5), e0156727.
88. Lehane, M. J. (2005). *The biology of blood-sucking in insects*. Cambridge, Cambridge University Press.
89. Li, Y., Chen, Z., Liu, Z., Liu, J., Yang, J., Li, Q., Li, Y., Cen, S., Guan, G., & Ren, Q. (2014). Molecular identification of *Theileria* parasites of northwestern Chinese Cervidae. *Parasites & Vectors*, *7*(1), 1-7.
90. Liu, M., Ruttayaporn, N., Saechan, V., Jirapattharasate, C., Vudriko, P., Moumouni, P. F. A., Cao, S., Inpankaew, T., Ybañez, A. P., & Suzuki, H. (2016). Molecular survey of canine vector-borne diseases in stray dogs in Thailand. *Parasitology International*, *65*(4), 357-361.
91. Livanova, N. N., Tikunov, A. Y., Kurilshikov, A. M., Livanov, S. G., Fomenko, N. V., Taranenko, D. E., Kvashnina, A. E., & Tikunova, N. V. (2015). Genetic diversity of *Ixodes pavlovskyi* and *I.*

persulcatus (Acari: Ixodidae) from the sympatric zone in the south of Western Siberia and Kazakhstan. *Experimental and Applied Acarology*, *67*, 441-456.

92. Long, G., Oprandy, J., Narayanan, R., Fortier, A., Porter, K., & Nacy, C. (1993). Detection of *Francisella tularensis* in blood by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, *31*(1), 152-154.
93. Maa, T. (1965). A synopsis of the Lipopteninae (Diptera: Hippoboscidae). *Journal of Medical Entomology*, *2*(3), 233-248.
94. Maa, T. (1969). A revised checklist and concise host index of Hippoboscidae (Diptera). *Pacific Insects Monograph*, *20*, 261-299.
95. Madslien, K., Ytrehus, B., Vikøren, T., Malmsten, J., Isaksen, K., Hygen, H. O., & Solberg, E. J. (2011). Hair-loss epizootic in moose (*Alces alces*) associated with massive deer ked (*Lipoptena cervi*) infestation. *Journal of Wildlife Diseases*, *47*(4), 893-906.
96. Madslien, K., Ytrehus, B., Viljugrein, H., Solberg, E. J., Bråten, K. R., & Mysterud, A. (2012). Factors affecting deer ked (*Lipoptena cervi*) prevalence and infestation intensity in moose (*Alces alces*) in Norway. *Parasites & Vectors*, *5*(1), 1-10.
97. Marshall, A. G. (1981). The sex ratio in ectoparasitic insects. *Ecological Entomology*, *6*(2), 155-174.
98. Maślanko, W., Bartosik, K., Raszewska-Famielec, M., Szwaj, E., & Asman, M. (2020). Exposure of humans to attacks by deer keds and consequences of their bites—A case report with environmental background. *Insects*, *11*(12), 859.
99. Matysek, M., & Kowal, J. (2014). Dwa nowe gatunki muchówek. *Tatry*, *48*, 64-65.
100. McFarlane, D. J., Rafter, M. A., Booth, D. T., & Walter, G. H. (2015). Behavioral responses of a tiny insect, the flower thrips *Frankliniella schultzei* Trybom (Thysanoptera, Thripidae), to atmospheric pressure change. *Journal of Insect Behavior*, *28*, 473-481.
101. Mencke, N. (2013). Future challenges for parasitology: vector control and ‘One health’in Europe: the veterinary medicinal view on CVBDs such as tick borreliosis, rickettsiosis and canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, *195*(3-4), 256-271.
102. Metelitsa, A. (1989). Parasitism of the louse fly *Lipoptena fortisetosa* on cattle. *Parazitologia*, *23*, 276-277.
103. Mihalca, A., Păstrav, I., Sándor, A., Deak, G., Gherman, C., Sarmaşi, A., & Votýpka, J. (2019). First report of the dog louse fly *Hippobosca longipennis* in Romania. *Medical and Veterinary Entomology*, *33*(4), 530-535.
104. Moyer, B. R., Drown, D. M., & Clayton, D. H. (2002). Low humidity reduces ectoparasite pressure: implications for host life history evolution. *Oikos*, *97*(2), 223-228.
105. Murad, H., & Ansari, M. S. (1980). Histomorphology of the Female Reproductive Organ of the Cattle Fly, *Hippobosca Maculata* Lch (Diptera: Hippoboscidae). *Netherlands Journal of Zoology*, *31*(2), 466-471.
106. Mustonen, A.-M., Käkelä, R., Paakkonen, T., & Nieminen, P. (2015). Life stage-related differences in fatty acid composition of an obligate ectoparasite, the deer ked (*Lipoptena cervi*)—Influence of blood meals and gender. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *179*, 62-70.
107. Mysterud, A., Madslien, K., Herland, A., Viljugrein, H., & Ytrehus, B. (2016). Phenology of deer ked (*Lipoptena cervi*) host-seeking flight activity and its relationship with prevailing autumn weather. *Parasites & Vectors*, *9*(1), 1-6.
108. Nieminen, P., Käkelä, R., Paakkonen, T., Halonen, T., & Mustonen, A.-M. (2013). Fatty acid modifications during autumnal cold-hardening in an obligatory ectoparasite, the deer ked (*Lipoptena cervi*). *Journal of Insect Physiology*, *59*(6), 631-637.
109. Nieminen, P., Paakkonen, T., Eerilä, H., Puukka, K., Riikonen, J., Lehto, V. P., & Mustonen, A. M. (2012). Freezing tolerance and low molecular weight cryoprotectants in an invasive parasitic fly,

the deer ked (*Lipoptena cervi*). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, *317*(1), 1-8.

110. Nirmala, X., Hypša, V., & Žurovec, M. (2001). Molecular phylogeny of Calyptratae (Diptera: Brachycera): the evolution of 18S and 16S ribosomal rDNAs in higher dipterans and their use in phylogenetic inference. *Insect Molecular Biology*, *10*(5), 475-485.
111. Oaaland, T., Christiansen, E., Jonsson, B., Kapperud, G., & Wiger, R. (1977). A survey of tularemia in wild mammals from Fennoscandia. *Journal of Wildlife Diseases*, *13*(4), 393-399.
112. Oboňa, J., Sychra, O., Greš, S., Heřman, P., Manko, P., Roháček, J., Šestáková, A., Šlapák, J., & Hromada, M. (2019). A revised annotated checklist of louse flies (Diptera, Hippoboscidae) from Slovakia. *ZooKeys*, *862*, 129.
113. Ochirkhuu, N., Konnai, S., Odbileg, R., Murata, S., & Ohashi, K. (2017). Molecular epidemiological survey and genetic characterization of *Anaplasma* species in Mongolian livestock. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *17*(8), 539-549.
114. Paakkonen, T. (2012). *Ecophysiology of the deer ked (Lipoptena cervi) and its hosts*. Doctoral dissertation, Itä-Suomen yliopisto
115. Paakkonen, T., Nieminen, P., Roininen, H., & Mustonen, A. M. (2014). Salt licks do not increase local densities of the deer ked, *Lipoptena cervi*, an abundant ectoparasite of cervids. *Medical and Veterinary Entomology*, *28*(3), 307-313.
116. Petersen, F. T., Meier, R., Kutty, S. N., & Wiegmann, B. M. (2007). The phylogeny and evolution of host choice in the Hippoboscoidea (Diptera) as reconstructed using four molecular markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *45*(1), 111-122.
117. Radzijevskaja, J., Paulauskas, A., Klepeckiene, K., Razanske, I., & Rosef, O. (2020). Species diversity and molecular characterization of deer keds (genus *Lipoptena*) from cervids. *Unpublished. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN889549 (accessed on 2 February 2020)*.
118. Rantanen, T., Reunala, T., Vuojolahti, P., & Hackman, W. (1982). Persistent pruritic papules from deer ked bites. *Acta Dermato-venereologica*, *62*(4), 307-311.
119. Regier, Y., Komma, K., Weigel, M., Pulliainen, A. T., Göttig, S., Hain, T., & Kempf, V. A. (2018). Microbiome analysis reveals the presence of *Bartonella* spp. and *Acinetobacter* spp. in deer keds (*Lipoptena cervi*). *Frontiers in Microbiology*, *9*, 3100.
120. Romaniuk, K., Gad, K., & Kiszka, W. (2008). Występowanie *Hippobosca equina* u koników polskich w okresie pastwiskowym. *Medycyna Weterynaryjna*, *64*, 155-156.
121. Sacristán, C., Das Neves, C. G., Suhel, F., Sacristán, I., Tengs, T., Hamnes, I. S., & Madslien, K. (2021). *Bartonella* spp. detection in ticks, Culicoides biting midges and wild cervids from Norway. *Transboundary and Emerging Diseases*, *68*(2), 941-951.
122. Salvetti, M., Bianchi, A., Marangi, M., Barlaam, A., Giacomelli, S., Bertoletti, I., Roy, L., & Giangaspero, A. (2020). Deer keds on wild ungulates in northern Italy, with a taxonomic key for the identification of *Lipoptena* spp. of Europe. *Medical and Veterinary Entomology*, *34*(1), 74-85.
123. Samuel, W., & Trainer, D. (1972). *Lipoptena mazamae* Rondani, 1878 (Diptera: Hippoboscidae) on white-tailed deer in southern Texas. *Journal of Medical Entomology*, *9*(1), 104-106.
124. Sawczuk, M., Maciejewska, A., & Skotarczak, B. (2008). Identification and molecular characterization of *Theileria* sp. infecting red deer (*Cervus elaphus*) in northwestern Poland. *European Journal of Wildlife Research*, *54*, 225-230.
125. Shabbir, M. Z., Akram, S., ul Hassan, Z., Hanif, K., Rabbani, M., Muhammad, J., Chaudhary, M. H., Abbas, T., Ghori, M. T., & Rashid, H. (2016). Evidence of *Coxiella burnetii* in Punjab province, Pakistan. *Acta Tropica*, *163*, 61-69.
126. Skvarla, M. J., & Machtinger, E. T. (2019). Deer keds (Diptera: Hippoboscidae: *Lipoptena* and *Neolipoptena*) in the United States and Canada: New state and county records, pathogen records, and an illustrated key to species. *Journal of Medical Entomology*, *56*(3), 744-760.

127. Šochová, E., Husník, F., Nováková, E., Halajian, A., & Hypša, V. (2017). *Arsenophonus* and *Sodalis* replacements shape evolution of symbiosis in louse flies. *PeerJ*, *5*, e4099.
128. Sokół, R., & Gałęcki, R. (2017). Prevalence of keds on city dogs in central P oland. *Medical and Veterinary Entomology*, *31*(1), 114-116.
129. Sokół, R., & Michalski, M. M. (2015). Occurrence of *Hippobosca equina* in Polish primitive horses during the grazing season. *Annals of Parasitology*, *61*(2).
130. Songailaitė, L., Klepeckienė, K., Paulauskas, A., & Radzijevskaja, J. (2018). Molecular detection of *Bartonella* spp. in deer keds *Lipoptena cervi* and *Lipoptena fortisetosa* in Lithuania. Smart Bio: ICSB 2nd international conference, 3-5 May 2018, Kaunas: abstracts book. Kaunas: Vytautas Magnus University, 2018,
131. Stefanidesova, K., Kocianova, E., Boldis, V., Kostanova, Z., Kanka, P., Nemethova, D., & Spitalska, E. (2008). Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* infection in free-ranging ungulates in central Slovakia. *European Journal of Wildlife Research*, *54*, 519-524.
132. Szalanski, A. L., Austin, J. W., McKern, J. A., Steelman, C. D., & Gold, R. E. (2014). Mitochondrial and ribosomal internal transcribed spacer 1 diversity of *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of Medical Entomology*, *45*(2), 229-236.
133. Szczurek, B., & Kadulski, S. (2004). Ectoparasites on fallow deer, *Dama dama* [L.] in Pomerania, Poland. *Acta Parasitologica*, *1*(49).
134. Szewczyk, T., Werszko, J., Steiner-Bogdaszewska, Ż., Jeżewski, W., Laskowski, Z., & Karbowiak, G. (2017). Molecular detection of *Bartonella* spp. in deer ked (*Lipoptena cervi*) in Poland. *Parasites & Vectors*, *10*, 1-7.
135. Theodor, O. (1967). Lipoptena parvula, n. sp., eine neue Art aus der Tschechoslowakei (Diptera, Hippoboscidae). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae*, *37*, 275-278.
136. Tichy, H., & Kallina, W. (2010). Insect hygroreceptor responses to continuous changes in humidity and air pressure. *Journal of Neurophysiology*, *103*(6), 3274-3286.
137. Trout, R., Steelman, C., & Szalanski, A. (2010). Phylogenetics and population genetics of the louse fly, Lipoptena mazamae, from Arkansas, USA. *Medical and Veterinary Entomology*, *24*(3), 258-265.
138. Välimäki, P., Madslien, K., Malmsten, J., Härkönen, L., Härkönen, S., Kaitala, A., Kortet, R., Laaksonen, S., Mehl, R., & Redford, L. (2010). Fennoscandian distribution of an important parasite of cervids, the deer ked (*Lipoptena cervi*), revisited. *Parasitology Research*, *107*, 117-125.
139. Víchová, B., Majláthová, V., Nováková, M., Majláth, I., Čurlík, J., Bona, M., Komjáti-Nagyová, M., & Peťko, B. (2011). PCR detection of re-emerging tick-borne pathogen, *Anaplasma phagocytophilum*, in deer ked (*Lipoptena cervi*) a blood-sucking ectoparasite of cervids. *Biologia*, *66*, 1082-1086.
140. Vikøren, T., Ytrehus, B., & Handeland, K. (2008). *Helseovervåkingsprogrammet for hjortevilt (HOP), Årsrapport for 2006 og 2007* National Veterinary Institute's Report Series.
141. Virey, J. J. (1844). *Historya obyczajów i zmyślności zwierząt, z podziałami metodycznemi i naturalnemi wszystkich ich gromad; kurs czytany w Ateneum królewskiem Paryzkiem przez JJ Virey: Przełożona z francuzkiego i wielu przypisami objaśniona przez Antoniego Wagę* (Vol. 2). Orgielbrand.
142. Ward, K., Lauf, S., Kleinschmit, B., & Endlicher, W. (2016). Heat waves and urban heat islands in Europe: A review of relevant drivers. *Science of the Total Environment*, *569*, 527-539.
143. Watanabe, Y., Fujihara, M., Obara, H., Matsubara, K., Yamauchi, K., & Harasawa, R. (2010). Novel hemoplasma species detected in free-ranging sika deer (*Cervus nippon*). *Journal of Veterinary Medical Science*, *72*(11), 1527-1530.
144. Weinberger, R. (2000). *Practical capillary electrophoresis*. Elsevier.
145. Wellington, W. (1946). Some reactions of muscoid Diptera to changes in atmospheric pressure. *Canadian Journal of Research*, *24*(4), 105-117.

146. Werszko, J., Steiner-Bogdaszewska, Ż., Jeżewski, W., Szewczyk, T., Kuryło, G., Wołkowycki, M., Wróblewski, P., & Karbowiak, G. (2020). Molecular detection of *Trypanosoma* spp. in *Lipoptena* cervi and *Lipoptena fortisetosa* (Diptera: Hippoboscidae) and their potential role in the transmission of pathogens. *Parasitology*, *147*(14), 1629-1635.
147. Yanovski, A. D., & Ogston, C. W. (1982). Sex differences in size of the blood meal in the bed bug *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of Medical Entomology*, *19*(1), 45-47.
148. Zalewski, D., Okarma, H., & Panek, M. (2018). *Monitoring Liczebności i Jakości Populacji Dzikich Zwierząt*. Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Katedra Hodowli Zwierząt Futerkowych i Łowiectwa.
149. Zeman, P. (1998). *Borrelia*-infection rates in tick and insect vectors accompanying human risk of acquiring Lyme borreliosis in a highly endemic region in Central Europe. *Folia Parasitologica*, *45*(4), 319-325.
150. Zheng, W., Liu, M., Moumouni, P. F. A., Liu, X., Efstratiou, A., Liu, Z., Liu, Y., Tao, H., Guo, H., & Wang, G. (2017). First molecular detection of tick-borne pathogens in dogs from Jiangxi, China. *Journal of Veterinary Medical Science*, *79*(2), 248-254.

12.Artykuły wraz z oświadczeniami współautorów

Olsztyn, 27.02.2023 r.

dr hab. Tadeusz Bakuła, prof. UWM

Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn

OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji naukowych w rozprawie doktorskiej lek. wet. Remigiusza Gałęckiego pod tytułem: „Deer keds (*Lipoptena* spp.) as a potential vector of infectious diseases in humans and animals - epizoonotic significance in Poland":

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.
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.
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.
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.

Oświadczam, że udział lek. wet. Remigiusza Gałęckiego w powstaniu powyższych publikacji był wiodący (poz. 1 –85%, poz. 2 –85%, poz. 3 –84%, poz. 4 –85%). Mój udział w przygotowaniu powyższych publikacjach polegał na pomocy w pozyskaniu finansowania, dyskusji nad badaniami i pomocy w weryfikacji ostatecznej wersji manuskryptu.

dr hab. Tadeusz Bakuła, prof. UWM

Olsztyn, 27.02.2023 r.

prof. dr hab. Jerzy Jaroszewski

Katedra Farmakologii i Toksykologii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn

OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji naukowych w rozprawie doktorskiej lek. wet. Remigiusza Gałęckiego pod tytułem: „Deer keds (*Lipoptena* spp.) as a potential vector of infectious diseases in humans and animals - epizoonotic significance in Poland":

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.
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.
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.
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.

Oświadczam, że udział lek. wet. Remigiusza Gałęckiego w powstaniu powyższych publikacji był wiodący (poz. 1 –85%, poz. 2 –85%, poz. 3 –84%, poz. 4 –85%). Mój udział w przygotowaniu powyższych publikacjach polegał na pomocy w pozyskaniu finansowania, dyskusji nad badaniami i pomocy w weryfikacji ostatecznej wersji manuskryptu.

prof. dr hab. Jerzy Jaroszewski

KIEROWNIK KATEDRY
FARMAKOLOGII I TOKSYKOLOGII
prof. dr hab. Jerzy Jaroszewski

National Research Center for Protozoan Diseases
OIE Collaborating Centre for Surveillance and Control of Animal Protozoan Diseases
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine
2-13 Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan
https://www.obihiro.ac.jp/facility/protozoa/en

Obihiro, 07.02.2023 r

Eloiza May Galon
National Research Center for Protozoan Diseases,
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,
Inadachō, Obihiro, Hokkaido 080-0834, Japan

STATEMENT

I consent to the use of the scientific publication listed below in the doctoral dissertation of Remigiusz Gałęcki, DVM under the title: „Deer keds (*Lipoptena* spp.) as a potential vector of infectious diseases in humans and animals - epizoonotic significance in Poland":

1. 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.

I declare that the participation of Remigiusz Gałęcki, DVM was a leader in the creation of the above publication (point 1 - 84%). My participation in the preparation of the above publication consisted in helping with preparing samples for sequencing.

Eloiza Galon

Eloiza May Galon

National Research Center for Protozoan Diseases
OIE Collaborating Centre for Surveillance and Control of Animal Protozoan Diseases
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine
2-13 Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan
https://www.obihiro.ac.jp/facility/protozoa/en

Obihiro, 07.02.2023 r.

Prof. Xuenan Xuan
National Research Center for Protozoan Diseases,
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,
Inadachō, Obihiro, Hokkaido 080-0834, Japan

STATEMENT

I consent to the use of the scientific publication listed below in the doctoral dissertation of Remigiusz Gałęcki, DVM under the title: „Deer keds (*Lipoptena* spp.) as a potential vector of infectious diseases in humans and animals - epizoonotic significance in Poland":

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.
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.
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.
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.

I declare that the participation of Remigiusz Gałęcki, DVM was a leader in the creation of the above publications (point 1 - 85%, point 2 - 85%, point 3 - 84%, point 4 - 85%). My participation in the preparation of the above publication consisted in enabling molecular research in the unit, funding and final verification of the manuscripts.

Prof. Xuenan Xuan

animals

MDPI

Article

Temporal-Microclimatic Factors Affect the Phenology of *Lipoptena fortisetosa* in Central European Forests

Remigiusz Gałęcki [1,*], Jerzy Jaroszewski [2], Xuenan Xuan [3] and Tadeusz Bakuła [1]

[1] Department of Veterinary Prevention and Feed Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 10-719 Olsztyn, Poland; bakta@uwm.edu.pl
[2] Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 10-719 Olsztyn, Poland; jerzyj@uwm.edu.pl
[3] National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro 080-8555, Japan; gen@obihiro.ac.jp
* Correspondence: remigiusz.galecki@uwm.edu.pl; Tel.: +48-89-523-49-08

Received: 18 September 2020; Accepted: 30 October 2020; Published: 1 November 2020



Simple Summary: The population of *Lipoptena* spp. continues to increase in Central Europe. Deer keds are obligatory hematophagous ectoparasites. Environmental conditions play a large role in the prevalence of these insects. However, the relationship between environmental conditions and population size has not been assessed in *Lipoptena fortisetosa*. The objective of this study was to find a link between *L. fortisetosa* flights and selected weather conditions in forests. Insects were sampled, and selected climatic factors were measured. The correlations between the number of insects and the examined factors were calculated with the use of statistical methods. The results suggest that the abundance of ectoparasites is correlated with time, temperature, relative humidity and wind speed. The beginning of ked flights could also be associated with variations in climatic conditions. In the future, these relationships can be used to minimize the negative impact of keds on humans, livestock and companion animals.

Abstract: The objective of this study was to determine the correlations between the abundance of *Lipoptena fortisetosa* on new potential hosts and selected temporal-microclimatic conditions in a forest at the beginning of the host-seeking period. Louse flies were collected between 6 May and 15 July of 2019 and 2020 in a natural mixed forest in Poland. Keds were collected by three investigators walking along the same forest route during each sampling session. The number of captured keds and the date (time), temperature (°C), relative humidity (%), air pressure (hPa) and wind speed (km/h) were recorded. A total of five measurements were performed during each sampling session. The influence of temporal-microclimatic conditions on the number of collected ectoparasites was evaluated with the use of a Generalized Additive Model (GAM). A total of 1995 individuals were obtained during field surveys. The results of the GAM revealed a correlation between the number of host seeking *L. fortisetosa* vs. time, temperature, relative humidity, and wind speed. An increase in temperature was most highly correlated with the abundance of louse flies in the environment.

Keywords: deer ked; ecophysiology; ectoparasite; louse flies; temporal-climatic variation; vector; phenology

1. Introduction

The presently observed climatic variations have led to changes in animal population dynamics as well as the appearance of new species in locations where they have never been known to occur [1–3]. These processes have significantly increased the population of ectoparasites in Europe. The population

of flies of the family Hippoboscidae has also increased over the years. New ked migration patterns have been observed, for example, the migration of louse flies to Fennoscandia. Keds have been migrating to Fennoscandia from the southeast since the early 1960s. The northern distribution limit currently lies at approximately 65° N and is gradually spreading northwards [4,5].

Keds are obligatory hematophagous ectoparasites of birds and mammals. They belong to the family Hippoboscidae, which comprises 21 genera, of which 4 feed primarily on mammals (including *Hippobosca* spp. and *Lipoptena* spp.) and 17 feed on birds. The genus *Lipoptena* spp. consists of 32 species. The species that are of greatest concern in veterinary medicine include *L. cervi*, *L. capreoli* and *L. fortisetosa*, which are commonly encountered in Europe, Siberia, China and North America, as well as *L. depressa*, *L. mazamae* and *Neolipoptena ferrisi*, which can be found in North America. Flies of the genera *Lipoptena* and *Neolipoptena* shed their wings after finding the definitive host. Keds are highly host-specific, and they breed only on wild ruminants. Louse flies are univoltine insects that reproduce by adenotrophic viviparity. Females produce larvae that do not have mouth hooks. The larvae molt several times; the last molt is retained, and it hardens on the pupa to form a puparium. Pupation lasts around 1 h, and pupae remain on the host's body or fall to the ground. The life cycle of keds is probably determined by climate conditions, and it lasts up to 30 days in a warm climate and 270–370 days in a temperate climate with winter diapause [6,7]. Soon after emergence, adult flies need to find a host in order to survive and breed.

The prevalence and intensity of *Lipoptena* spp. infestation in specific hosts (cervids) can be very high. In Poland, large numbers of cervids and other animal species have been found to be infected with this ectoparasite. Deer keds were identified in 64% of European roe deer [8], 76% of fallow deer and 78% of European red deer [9]. Louse fly infestations have also been reported in the European bison [10] and in nonspecific hosts such as companion animals [2]. These ectoparasites also colonize livestock [11]. *Lipoptena* spp. can land on and bite humans [12,13]. Humans bitten by these ectoparasites are at risk of dermatitis, allergic rhinoconjunctivitis or even anaphylactic shock. Deer keds pose a potential threat of horizontal transmission of pathogens [14–17].

Environmental conditions play a large role in the abundance of *Lipoptena* spp. It should be noted that weather conditions can also significantly affect the behavior and physiology of keds [18]. *Lipoptena cervi* pupae are able to survive winter even in the cold regions of northern European [19]. Research indicates that these ectoparasites have developed strong adaptive mechanisms to low temperatures. Härkönen et al. [20] reported that *L. cervi* can survive in adverse conditions even without an acclimatization period. Keds caught in late autumn were characterized by a significantly higher ratio of unsaturated to saturated fatty acids, which probably enhances the fluidity of lipid membranes and promotes the maintenance of protein functions at low ambient [21]. Due to higher concentrations of free amino acids after cold acclimation, keds could be a freeze-tolerant species with a supercooling point of −7.8 °C and a lower lethal temperature of −16 °C [22]. The above not only contributes to ectoparasite migration to colder areas, but it can also induce changes in their seasonal abundance and increase ked survival rates due to higher tolerance to low temperature. However, these factors have never been investigated in *L. fortisetosa*.

Previous studies confirmed the role of temperature and annual variations in climate on the abundance of *L. cervi* [19,23]. However, most research was based on data from weather stations and meteorological centers. Meanwhile, the microclimate of specific ecosystems such as forests may differ from meteorological data [24,25]. Differences in microclimate can play an important role even in small areas and forests on account of their specific topography [26,27]. The forest is the natural biotope for *L. fortisetosa*, but the factors that influence the abundance of keds in forests have never been identified. There are no reports describing the impact of climatic conditions at the beginning of the flight activity season on the prevalence of *L. fortisetosa*. Differences in gender distribution over time have never been investigated. Moreover, the impact of climate on *L. fortisetosa* has never been analyzed in Central Europe.

The objective of this study was to identify the correlations between the abundance of *L. fortisetosa* among new potential hosts and selected temporal-microclimatic conditions in forests at the beginning of the host-seeking period.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Collection

Louse flies were collected between 6 May and 15 July of 2019 and 2020 in a natural mixed forest in Olsztynek municipality, Warmian-Masurian voivodeship in Poland (53°40′31.4″ N 20°20′00.4″ E). This study period was chosen because it did not coincide with the animal breeding season or forest management activities and it was characterized by a noticeable increase in entomofauna activity. Coniferous trees, mainly Scots pine, were predominant in the studied forest. The underwood and undergrowth consisted of plant species typical of the local climate and geographic zone. The undergrowth was covered with a layer of herbaceous plants and moss. The research area was a habitat of a large cervid population, including red deer, European roe deer and moose. The forest also met all habitat characteristics and did not feature any negative factors associated with the intensity of ked activity, described by Madslien et al. [28]. Keds were collected by three investigators walking along the same forest route during each sampling session. The exact route had been determined before the experiment, and it spanned a distance of 5.81 km based on GPSMAP® 62 readouts (Garmin, Olathe, KS, USA). The altitude range was between 151 and 158 m above sea level. The sampling route intersected animal migration routes, and fresh traces of animal activity were found. Human activity that could potentially influence the results was not observed. A total of 140 observations were carried out. The measurements were performed between 1:00 p.m. and 5:00 p.m. (data were not recorded outside this time interval). The investigators walked for 15 minutes and then paused for 10 minutes. They wore brown cotton clothing covering the entire body and collected keds immediately after they had landed on the clothing. Similar methods are used to sample ticks and ectoparasites [23,29]. The acquired ectoparasites were placed in separate test tubes.

2.2. Species Identification

Ked samples were transported to the Biological Hazard Laboratory at the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn. Ked species and sex were identified based on their morphological characteristics under the Leica M165C stereoscopic microscope. Louse flies were identified to species level based on body dimensions, wing venation, length and structure of palpi, and the number of erect hairs on the mesonotum [6,30,31]. Samples containing species other than *L. fortisetosa* were eliminated from further analysis.

2.3. Microclimate Measurements

The number of collected keds, and the sampling date (time in days), temperature (°C), relative humidity (%), air pressure (hPa), and wind speed (km/h), were recorded. The measurements were performed before each sampling session, every hour during the field trial, and after its completion. A total of five measurements were performed during each sampling session. Selected microclimate parameters were measured with the ST−8820 Multi-Function Environment Meter (Cem, Shenzhen, China) (temperature, relative humidity), Testo 511 manometer (Testo SE and Co. KGaA, Lenzkirch, Germany) (air pressure) and Kestrel 2000 anemometer (Kestrel Instruments, Boothwyn, PA, USA) (wind speed). The devices had been calibrated by the manufacturers before the experiment. All measurements were performed at shoulder height by the same investigator.

2.4. Statistical Analysis

The assumption of linearity and normality was checked before the statistical analysis. Two-dimensional scatter plots of the analyzed variables were generated to examine linearity. The assumption of normality was validated with the use of histograms and normality charts for residues. Statistical anomalies were ruled out with the k-nearest neighbors algorithm. Statically significant differences between the sex distribution of *L. fortisetosa* and time were determined with the use of the General Linear Model (GLM). Linear correlation models (Pearson's correlation coefficient—*r*) were built

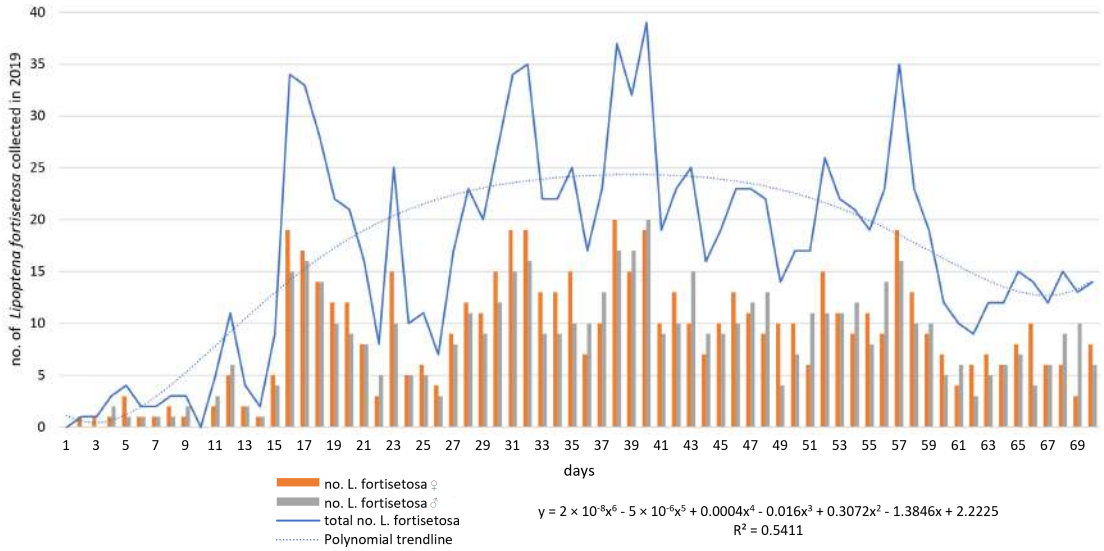
to illustrate the correlations between temporal-microclimatic conditions and the number of collected *L. fortisetosa*. The calculated values of *r* were interpreted as follows: below 0.2—absence of correlation, 0.2–0.4—weak correlation, 0.4–0.6—moderate correlation, 0.6–0.8—strong correlation, 0.8–0.9—very strong correlation and 0.9–1.0—nearly perfect correlation. The influence of temporal-microclimatic conditions on the number of collected ectoparasites was evaluated with the use of the Generalized Additive Model (GAM). The model was built to maximize the prediction quality of the dependent variable (abundance of deer keds) based on the analyzed covariates (time, temperature, relative humidity, air pressure and wind speed). The following statistical descriptors were calculated for the collected samples: mean (*M*), median (*ME*), standard deviation (*SD*), standard error (*SE*), variance (*V*), minimum (*Min*), maximum (*Max*), kurtosis (*K*) and skewness (*Ske*). Differences were regarded as significant at $p < 0.05$. Data were processed in the Statistica 13.3 program with a medical application (TIBCO Software, Palo Alto, CA, USA).

2.5. Model Validation

The developed Generalized Additive Model was evaluated (without the time covariate) in four different locations (I—53°39′34.2″ N 20°30′46.0″ E; II—52°09′59.9″ N 18°18′55.9″ E; III—52°11′27.6″ N 17°51′53.0″ E; IV—53°28′24.8″ N 20°34′04.9″ E). In each location, three measurements were made according to the sampling and measuring protocols described above.

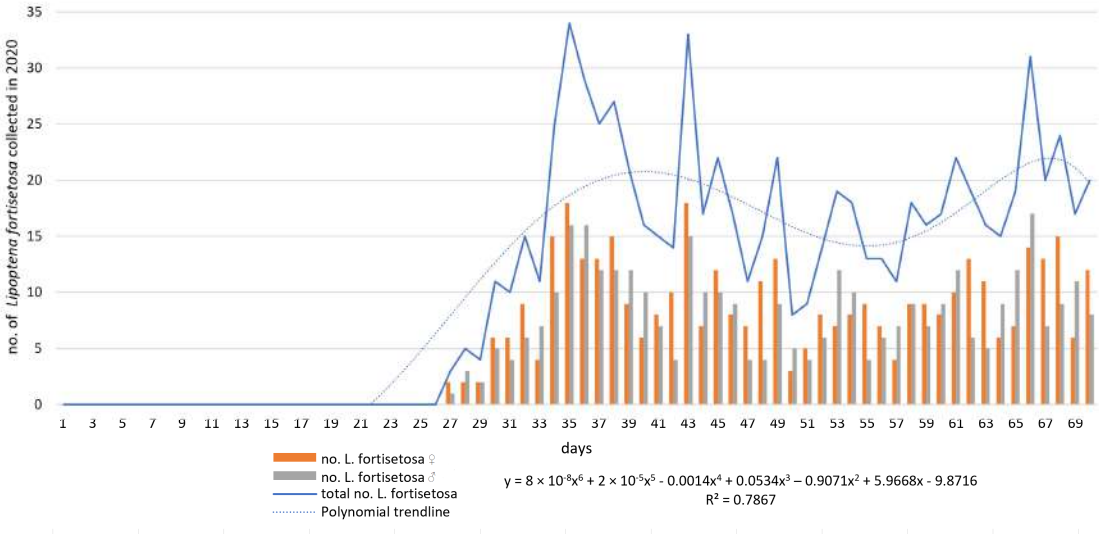
3. Results

The first louse flies to be identified as *L. fortisetosa* were collected on 7 May 2019 and 2 June 2020. During field tests, a total of 1995 individuals (*M* = 14.25; *ME* = 14.5; *SD* = 10.96; *SE* = 0.93; *V* = 76.87; *Min* = 0; *Max* = 39.0; *K* = −0.94; *Ske* = 0.23) were sampled, including 1028 (51.53%) females and 967 (48.47%) males. Differences in sex distribution as a function of time were not statistically significant (for the model: *df* = 1; *MS* = 225.04; *F* = 5.38; *p*-value = 0.02; female vs. male: *df* = 1; *MS*= 2.61; *F* = 0.78; *p*-value = 0.38; male vs. female vs. time: *df* = 1; *MS* = 0.047; *F* = 0.014; *p*-value = 0.91). The first peaks denoting high levels of ked activity were observed on day 16 in 2019 and day 35 in 2020. The number of louse flies collected on each sampling day is presented in Figure 1.



(**A**)

Figure 1. *Cont.*



(**B**)

Figure 1. The number of *Lipoptena fortisetosa* specimens collected on each sampling day between 6 May and 15 July in 2019 (**A**) and 2020 (**B**). Legend: y—logarithmic function; R^2—coefficient of determination.

A very high linear correlation was noted between temperature and the abundance of *L. fortisetosa*. Relative humidity was bound by a high linear correlation with ked flights. A moderate linear correlation was determined between time and the prevalence of *L. fortisetosa*. A negative moderate linear correlation was observed between wind speed and louse abundance. No significant correlations were noted between *L. fortisetosa* abundance and air pressure. The results of the correlation analysis are presented in Table 1.

Table 1. Correlations between temporal-microclimatic conditions and the abundance of *Lipoptena fortisetosa* (Pearson's correlation coefficient *r*).

Correlations Between the Studied Factors		Values	
		***p*-Value**	***r***
Number of sampled *Lipoptena fortisetosa*	time (days)	<0.001	0.45
	temperature (°C)	<0.001	0.84
	relative humidity (%)	<0.001	0.76
	air pressure (hPa)	0.15	−0.19
	wind speed (km/h)	<0.001	−0.59

Legend: *p*-values < 0.05 were considered significant.

The results of the GAM indicate that time, temperature, relative humidity and wind speed significantly influenced ked flights. The possible nonlinear effects of continuous covariates when the abundance of *L. fortisetosa* was taken into account are presented in Figure 2. The prevalence of *L. fortisetosa* increased significantly between days 15 and 20 (Figure 2A), and a minor decrease was observed on the following days. Temperatures below 5 °C had a negative effect on *L. fortisetosa* abundance. The conducted measurements indicate that keds thrived at a temperature of 17–22 °C (Figure 2B). The GAM revealed that above-optimal temperatures may not exert a positive effect on louse prevalence. In the model, ked abundance was also somewhat correlated with relative humidity. The number of recorded ectoparasites tended to increase with a rise in humidity. Ked abundance was relatively stable within the humidity range of 70–80% (Figure 2C). The optimal wind speed for *L. fortisetosa* was 4–12 km/h (Figure 2E), and higher wind speeds exerted a negative effect on ked abundance. Air pressure was not significantly correlated with the prevalence of *L. fortisetosa* (Figure 2D). The results of the GAM are presented in Table 2. The results of model validation are presented in Table 3.

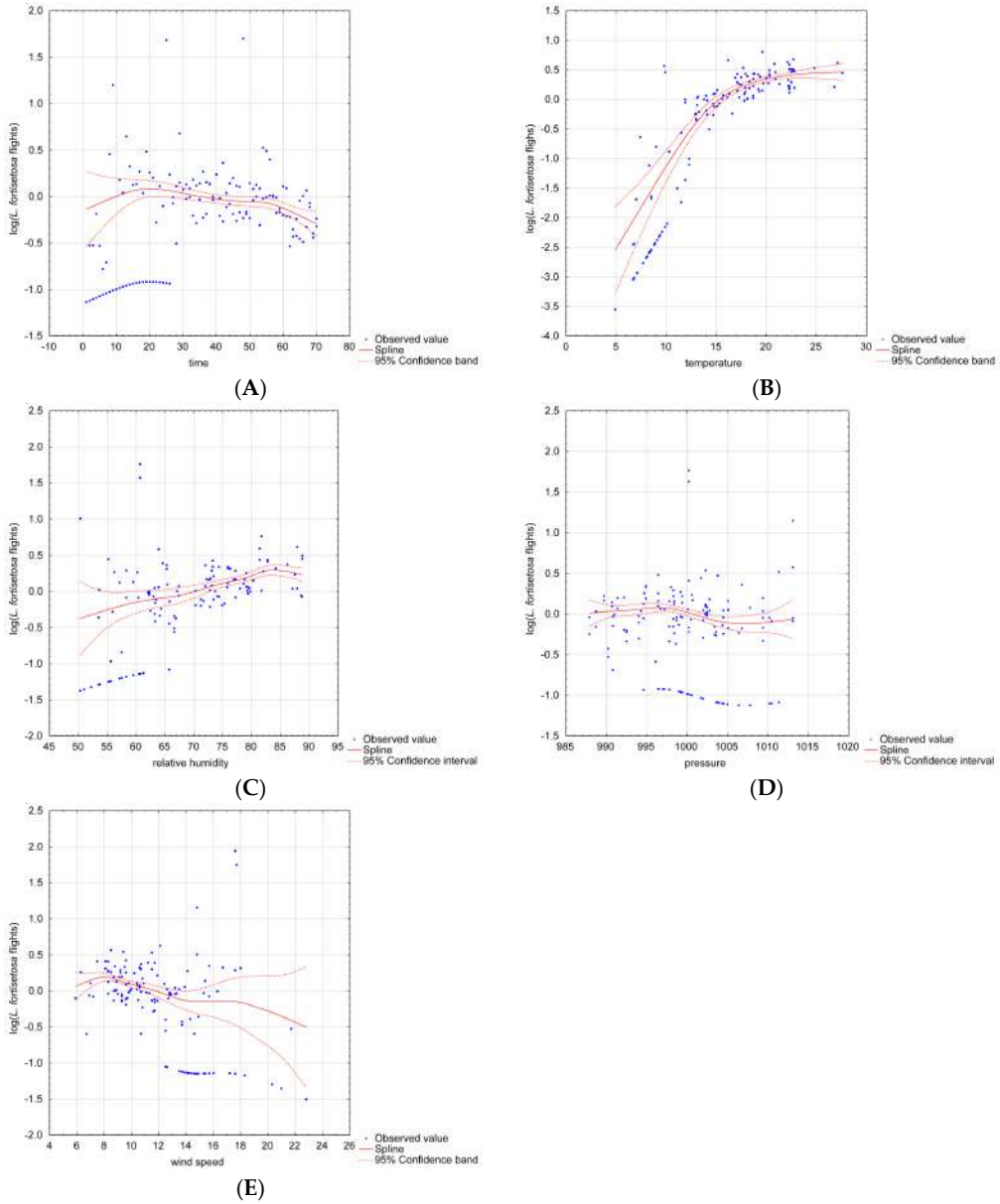


Figure 2. Nonlinear effects of different continuous covariates on *Lipoptena fortisetosa* abundance. Legend: the plots present the results of two-dimensional cubic spline interpolation with the observed predictor values plotted against the partial residuals; (**A**) time, (**B**) temperature, (**C**) relative humidity, (**D**) air pressure* and (**E**) wind speed; *—not significant.

Table 2. Parameter estimates in the Generalized Additive Model (GAM) analyzing the correlations between temporal-microclimatic factors and *Lipoptena fortisetosa* abundance.

Parameters n **= 140**	**Values**				
	df	**GAM coef.**	***SE***	***SS***	***p*-Value**
Intercept	1	1.12	0.23	4.82	0.005
Time	4.15	−0.0054	0.0013	−4.21	0.038
Temperature	4.06	0.057	0.0068	8.39	<0.001
Relative humidity	4.02	0.017	0.0029	5.29	0.041
Air pressure	4.04	−0.0086	0.0035	−2.42	0.074
Wind speed	3.94	−0.026	0.0088	−3.04	0.003

Legend: n—number of measurements; *df*—degrees of freedom; GAM coef.—Generalized Additive Model coefficient; *SE*—Standard Error; *SS*—Standard Score; p-values < 0.05 were considered significant.

Table 3. Validation of the GAM in different locations.

Location $n = 12$	Temperature		Relative humidity		Air pressure		Wind speed	
	°C	log(*L. fortisetosa* flights)	%	log(*L. fortisetosa* flights)	hPa	log(*L. fortisetosa* flights)	km/h	log(*L. fortisetosa* flights)
I	18.1	0.29	72.6	0.11	1002.4	0.44	13.3	−0.17
	19.5	0.40	77.8	0.17	1001.2	0.48	14.7	−0.26
	15.2	−0.06	68.2	0.07	998.5	0.22	8.2	0.28
II	19.3	0.27	62.4	−0.06	1001.6	−0.19	15.5	−0.07
	17.9	0.23	64.3	−0.13	997.3	0.05	8.0	0.34
	20.6	0.36	67.7	0.002	1000.6	0.12	10.2	0.09
III	22.3	0.41	74.8	0.29	1002.7	−0.29	8.9	0.05
	21.7	0.34	76.0	0.14	1005.2	0.33	6.8	0.21
	18.8	0.12	71.9	−0.03	1003.7	−0.16	10.6	0.04
IV	22.3	0.33	67.8	0.05	1000.8	−0.31	16.1	−0.32
	17.4	0.12	70.4	−0.08	999.2	0.25	10.3	0.08
	19.1	0.28	71.3	0.16	−0.07	1003.4	0.05	10.2

Legend: *n*—number of measurements; I-IV—surveyed locations.

4. Discussion

The population of *L. fortisetosa* continues to increase in the natural environment. These ectoparasites are also found in nonspecific environments such as cities [2]. In the future, the size of *L. fortisetosa* populations is likely to increase, and the species could also be expected to colonize new ecosystems, due to both climate change and the penetration of wild ruminants into rural/city areas. The phenology of the analyzed ectoparasites is one of the most important considerations in epidemiological monitoring. The phenology of *L. cervi* has been described in detail in Northern Europe [29]. However, no such research has been conducted in Central Europe (research site), where the population of *L. fortisetosa* continues to grow. Our previous study conducted in 2017–2018 confirmed the occurrence of *L. fortisetosa* in May, but accurate microclimatic measurements were not performed. These findings differ from the observations made in other species of louse flies. The variations in ked phenology could be linked to an increase in temperatures in Europe [32,33]. Monitoring programs in Central Europe have revealed an increase in average temperatures, in particular between January and August, as well as temperature extremes between 1961 and 2010 [34].

This study confirmed the presence of correlations between temporal-microclimatic factors and number of flies seeking new hosts. A strong relationship was noted between temperature and the abundance of flies. The time of measurement was also a significant factor, but it was far less correlated with the number of collected flies than temperature. A similar relationship was noted between the abundance of *L. fortisetosa* and humidity. A minor decrease in the size of the collected samples was observed on successive days of field tests, which points to the absence of new generations. Sex distribution was not correlated with the time of measurements.

Similar correlations between temperature and abundance of *L. cervi* have been described by Härkönen et al. [19], Mysterlund et al. [23] and Välimäki et al. [35]. The cited studies were conducted in regions with a different climate and different animal populations than in Poland. Temperature could significantly affect the developmental cycle of *L. fortisetosa* by disrupting winter diapause. Multiple pathways are associated with diapause completion, and the stages of the developmental cycle are modified by environmental conditions [36]. Hodek and Hodková [36] reported that diapause is successfully completed at intermediate or high temperatures, and can even be stimulated by high temperature. The beginning of the flight activity season can also be influenced by cryoprotectants [21,22]. In the future, the continued emergence of cryoprotectants could alter the correlations between the abundance of *Lipoptena* spp. and environmental factors. Cryoprotectants can also contribute to a rise in the population of *L. fortisetsa* by decreasing the mortality of pupae in winter. However, cold temperature plays a certain role in the life cycle of deer keds. Härkönen and Kaitala [37] argued that *L. cervi* pupae require longer exposure to high temperatures to terminate diapause if the cold period is short. This phenomenon could be the main reason behind the observed differences in phenology. High temperatures most probably prolonged winter diapause.

Photoperiodism could be responsible for the correlation between time and *L. fortisetosa* flights. However, the emergence of adult *L. cervi* was not correlated with two photoperiods under laboratory conditions [38]. In contrast, Mysterud et al. [23] speculated that photoperiod could be an important factor under field conditions. Light exposure plays an important role in other Hippoboscidae ectoparasites. For example, *Pseudolynchia canariensis* emerge only in selected photoperiods [39], whereas *Hippobosca equina* flights are more frequent at certain times of the day [40]. The importance of photoperiod could also be associated with the strong correlation between measurement date and temperature. Further research is needed to investigate the effect of photoperiod on *L. fortisetosa* activity.

The results of the present study also suggest that ectoparasite activity could be correlated with variations in relative humidity. Moyer et al. [41] reported that abiotic factors such as relative humidity can induce significant changes in ectoparasite pressure on the host population. Low humidity can inhibit pupal development [38]. According to Bakhtushkina [42], the lifespan of *L. cervi* increases with a rise in humidity. Ectoparasites have the longest lifespan within a humidity range of 60–80% and a temperature range of 14–16 °C. Under laboratory conditions, pupal development lasts 90 days on

average at a temperature of around 20–25 °C and estimated humidity of 60–80% [42]. Our research suggests that similar relationships could occur in a forest environment. The optimal humidity and temperature of ambient air for the survival of *L. cervi* imagines were established at ≥70% and 2–5 °C, respectively, by Popov [43]. Therefore, relative humidity could be associated with the number of *L. fortisetosa* seeking new hosts.

A significant correlation between air pressure and ked abundance was not observed in this study. The impact of air pressure on insect activity has been confirmed by other authors. According to Wellington [44], a decrease in barometric pressure stimulates general activity in muscoids. However, the sensitivity of the receptors responsible for monitoring air pressure may vary between insect species [45]. McFarlane et al. [46] found that *Frankliniella schultzei* was capable of detecting changes in atmospheric pressure. In insects, the mechanisms for monitoring air pressure could have evolved to offer protection against adverse weather events. Despite the absence of significant correlations between air pressure and insect abundance, this mechanism cannot be ruled out in the current study. However, further research is needed to investigate the responses of *L. fortisetosa* within a wider range of air pressure values.

The calculated values of *r* and the results of the GAM revealed a significant correlation between the number of host-seeking *L. fortisetosa* and wind speed. According to Härkönen et al. [19], the suitability of northern habitats for ambushing hosts, especially in the treeless tundra, could be compromised by difficult flying conditions, such as strong winds. Research carried out in eastern Finland by Paakkonen et al. [47] confirmed that the number of deer keds is inversely correlated with windiness. The presence of such a relationship can also be inferred from the behavior of reindeers, which use windy mountaintops primarily to avoid ectoparasite harassment [48].

The GAM was applied in the study to account for the relationships between the analyzed covariates. However, the presented correlations do not necessarily prove a direct cause-and-effect relationship. It is possible that the described factors are correlated with an unknown variable or a set of variables. The number of sampled keds as well as the beginning of the flight activity season could be influenced by more profound changes in a system of complex environmental (e.g., deer migrations) and weather (e.g., insolation) variables.

5. Conclusions

A thorough knowledge about the activity of *L. fortisetosa* is needed to address the steady increase in the population of these ectoparasites and seasonal changes in their abundance. Climate change could be an important factor in the observed phenomena. The variations in selected microclimatic factors were correlated with the number of host-seeking keds in the environment. Higher temperatures were strongly correlated with an increase in ked abundance in the surveyed forest. In the group of the studied factors, temperature was primarily responsible for the beginning of the flight activity season of *L. fortisetosa*. However, the presented correlations are not necessarily indicative of a cause-and-effect relationship. These ectoparasites are potential pathogen vectors, which is why their population, behavior and phenology should be regularly monitored. Further research should focus not only on the epidemiology and spread of *L. fortisetosa*, but also on the effectiveness of repellents. Environmental observations should be carried out to determine the number of new generations in one flight activity season in a changing climate. In the future, information about the phenology of the species and the relationships between the described factors can be used to develop preventive programs and control ked infestation in the environment. Preventive measures should also be implemented to minimize the negative impact of keds on humans, livestock and companion animals.

Author Contributions: Conceptualization, R.G.; methodology, R.G.; software, R.G.; validation, R.G.; formal analysis, R.G.; investigation, R.G.; resources, R.G.; data curation, R.G.; writing—original draft preparation, R.G.; writing—review and editing, R.G, J.J., X.X. and T.B.; visualization, R.G.; supervision, J.J., X.X. and T.B.; project administration, R.G.; funding acquisition, R.G., J.J. and T.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Project financially co-supported by the Minister of Science and Higher Education under the program entitled "Regional initiative of Excellence" for the years 2019–2022, Project No. 010/RID/2018/19, amount of funding PLN 12,000,000. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Acknowledgments: The authors would like to thank the "Healthy Animal-Safe Food" Scientific Consortium of the Leading National Research Center (KNOW) (grant No. 05-1/KNOW2/2015) for supporting cooperation between the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn and the National Research Center for Protozoan Diseases of the Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kowal, J.; Nosal, P.; Rościszewska, M.; Matysek, M. New records of *Lipoptena fortisetosa* Maa, 1965 (Diptera:Hippoboscidae) in Poland. *Dipteron* **2009**, *25*, 27–29.
2. Sokół, R.; Gałęcki, R. Prevalence of keds on city dogs in central Poland. *Med. Vet. Entomol.* **2017**, *31*, 114–116. [CrossRef] [PubMed]
3. Hansford, K.M.; Carter, D.; Gillingham, E.L.; Hernandez-Triana, L.M.; Chamberlain, J.; Cull, B.; McGinley, L.; Phipps, L.P.; Medlock, J.M. *Hyalomma rufipes* on an untraveled horse: Is this the first evidence of Hyalomma nymphs successfully moulting in the United Kingdom? *Tick-Borne Dis.* **2019**, *10*, 704–708. [CrossRef] [PubMed]
4. Hackman, W. The colonization of Finland by the deer ked, *Lipoptena cervi* L.(Dipt., Hippoboscidae). *Entomol. Tidskr.* **1979**, *100*, 209–210.
5. Hackman, W.; Rantanen, T.; Vuojolahti, R. Immigration of *Lipoptena cervi* (Diptera, Hippoboscidae) in Finland, with notes on its biology and medical significance. *Notulae Entomol.* **1983**, *63*, 53–59.
6. Borowiec, L. Część XXVIII Muchówki—Diptera. Zeszyt 77 Wpleszczowate—Hippoboscidae. In *Klucze do Oznaczania Owadów Polski*; PWN: Warszawa, Poland, 1984; pp. 3–35.
7. McAlpine, J.F. *Manual of Nearctic Diptera*; Research Branch, Agriculture: Regina, SK, Canada, 1987; Volume 2, pp. 1271–1332.
8. Kadulski, S. Ectoparasites of Cervidae in north-east Poland. *Acta Parasitol.* **1996**, *41*, 204–210.
9. Szczurek, B.; Kadulski, S. Ectoparasites on fallow deer, *Dama dama* (L.) in Pomerania, Poland. *Acta Parasitol.* **2004**, *49*, 80–86.
10. Izdebska, J.N. European bison arthropod parasites from closed Polish breeding facilities. *Acta Parasitol.* **2001**, *46*, 135–137.
11. Dehio, C.; Sauder, U.; Hiestand, R. Isolation of *Bartonella schoenbuchensis* from *Lipoptena cervi*, a blood-sucking arthropod causing deer ked dermatitis. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 5320–5323. [CrossRef]
12. Härkönen, S.; Laine, M.; Vornanen, M.; Reunala, T. Deer ked (*Lipoptena cervi*) dermatitis in humans–an increasing nuisance in Finland. *Alces* **2009**, *45*, 73–79.
13. Kortet, R.; Härkönen, L.; Hokkanen, P.; Härkönen, S.; Kaitala, A.; Kaunisto, S.; Laaksonen, S.; Kekalainen, J.; Ylonen, H. Experiments on the ectoparasitic deer ked that often attacks humans; preferences for body parts, colour and temperature. *Bull. Entomol. Res.* **2010**, *100*, 279–285. [CrossRef] [PubMed]
14. De Bruin, A.; Van Leeuwen, A.D.; Jahfari, S.; Takken, W.; Földvári, M.; Dremmel, L.; Sprong, H.; Földvári, G. Vertical transmission of *Bartonella schoenbuchensis* in *Lipoptena cervi*. *Parasit. Vectors* **2015**, *8*, 176. [CrossRef] [PubMed]
15. Szewczyk, T.; Werszko, J.; Steiner-Bogdaszewska, Ż.; Jeżewski, W.; Laskowski, Z.; Karbowiak, G. Molecular detection of *Bartonella* spp. in deer ked (*Lipoptena cervi*) in Poland. *Parasit. Vectors* **2017**, *10*, 487. [CrossRef] [PubMed]
16. Korhonen, E.M.; Vera, C.P.; Pulliainen, A.T.; Sironen, T.; Aaltonen, K.; Kortet, R.; Härkönen, L.; Härkönen, S.; Paakkonen, T.; Nieminen, P.; et al. Molecular detection of Bartonella spp. in deer ked pupae, adult keds and moose blood in Finland. *Epidemiol. Infect.* **2015**, *143*, 578–585. [CrossRef] [PubMed]
17. Lee, S.H.; Kim, K.T.; Kwon, O.D.; Ock, Y.; Kim, T.; Choi, D.; Kwak, D. Novel detection of *Coxiella* spp., *Theileria luwenshuni*, and *T. ovis* endosymbionts in deer keds (*Lipoptena fortisetosa*). *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0156727. [CrossRef]
18. Kaunisto, S.; Härkönen, L.; Niemelä, P.; Roininen, H.; Ylönen, H. Northward invasion of the parasitic deer ked (*Lipoptena cervi*), is there geographical variation in pupal size and development duration? *Parasitology* **2011**, *138*, 354–363. [CrossRef]

19. Härkönen, L.; Härkönen, S.; Kaitala, A.; Kaunisto, S.; Kortet, R.; Laaksonen, S.; Ylönen, H. Predicting range expansion of an ectoparasite–the effect of spring and summer temperatures on deer ked *Lipoptena cervi* (Diptera: Hippoboscidae) performance along a latitudinal gradient. *Ecography* **2010**, *33*, 906–912. [CrossRef]
20. Härkönen, L.; Kaitala, A.; Kaunisto, S.; Repo, T. High cold tolerance through four seasons and all free-living stages in an ectoparasite. *Parasitology* **2012**, *139*, 926–933. [CrossRef]
21. Nieminen, P.; Käkelä, R.; Paakkonen, T.; Halonen, T.; Mustonen, A.M. Fatty acid modifications during autumnal cold-hardening in an obligatory ectoparasite, the deer ked (*Lipoptena cervi*). *J. Insect Physiol.* **2013**, *59*, 631–637. [CrossRef]
22. Nieminen, P.; Paakkonen, T.; Eerilä, H.; Puukka, K.; Riikonen, J.; Lehto, V.P.; Mustonen, A.M. Freezing tolerance and low molecular weight cryoprotectants in an invasive parasitic fly, the deer ked (*Lipoptena cervi*). *J. Exp. Zool. A* **2012**, *317*, 1–8. [CrossRef]
23. Mysterud, A.; Madslien, K.; Herland, A.; Viljugrein, H.; Ytrehus, B. Phenology of deer ked (*Lipoptena cervi*) host-seeking flight activity and its relationship with prevailing autumn weather. *Parasit. Vectors* **2016**, *9*, 95. [CrossRef] [PubMed]
24. Aussenac, G. Interactions between forest stands and microclimate: Ecophysiological aspects and consequences for silviculture. *Ann. Forest Sci.* **2000**, *57*, 287–301. [CrossRef]
25. Larrieu, L.; Paillet, Y.; Winter, S.; Bütler, R.; Kraus, D.; Krumm, F.; Lachat, T.; Michel, A.K.; Regnery, B.; Vandekerkhove, K. Tree related microhabitats in temperate and Mediterranean European forests: A hierarchical typology for inventory standardization. *Ecol. Indic.* **2018**, *84*, 194–207. [CrossRef]
26. Bohlman, S.A.; Matelson, T.J.; Nadkarni, N.M. Moisture and temperature patterns of canopy humus and forest floor soil of a montane cloud forest, Costa Rica. *Biotropica* **1995**, *27*, 13–19. [CrossRef]
27. Chen, J.; Saunders, S.C.; Crow, T.R.; Naiman, R.J.; Brosofske, K.D.; Mroz, G.D.; Brookshire, B.L.; Franklin, J.F. Microclimate in forest ecosystem and landscape ecology: Variations in local climate can be used to monitor and compare the effects of different management regimes. *BioScience* **1999**, *49*, 288–297. [CrossRef]
28. Madslien, K.; Ytrehus, B.; Viljugrein, H.; Solberg, E.J.; Bråten, K.R.; Mysterud, A. Factors affecting deer ked (*Lipoptena cervi*) prevalence and infestation intensity in moose (*Alces alces*) in Norway. *Parasit. Vectors* **2012**, *5*, 251. [CrossRef]
29. Ginsberg, H.S.; Ewing, C.P. Comparison of flagging, walking, trapping, and collecting from hosts as sampling methods for northern deer ticks, *Ixodes dammini*, and lone-star ticks, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* **1989**, *7*, 313–322. [CrossRef]
30. Andreani, A.; Sacchetti, P.; Belcari, A. Comparative morphology of the deer ked *Lipoptena fortisetosa* first recorded from Italy. *Med. Vet. Entomol.* **2019**, *33*, 140–153. [CrossRef]
31. Salvetti, M.; Bianchi, A.; Marangi, M.; Barlaam, A.; Giacomelli, S.; Bertoletti, I.; Roy, L.; Giangaspero, A. Deer keds on wild ungulates in northern Italy, with a taxonomic key for the identification of spp. of Europe. *Med. Vet. Entomol.* **2020**, *34*, 74–85. [CrossRef]
32. Christidis, N.; Jones, G.S.; Stott, P.A. Dramatically increasing chance of extremely hot summers since the 2003 European heatwave. *Nat. Clim. Chang.* **2015**, *5*, 46–50. [CrossRef]
33. Ward, K.; Lauf, S.; Kleinschmit, B.; Endlicher, W. Heat waves and urban heat islands in Europe: A review of relevant drivers. *Sci. Total Environ.* **2016**, *569*, 527–539. [CrossRef]
34. Hoy, A.; Feske, N.; Štěpánek, P.; Skalák, P.; Schmitt, A.; Schneider, P. Climatic Changes and Their Relation to Weather Types in a Transboundary Mountainous Region in Central Europe. *Sustainability* **2018**, *10*, 2049. [CrossRef]
35. Välimäki, P.; Madslien, K.; Malmsten, J.; Härkönen, L.; Härkönen, S.; Kaitala, A.; Kortet, R.; Laaksonen, S.; Mehl, R.; Redford, L.; et al. Bjørnar Ytrehus Fennoscandian distribution of an important parasite of cervids, the deer ked (*Lipoptena cervi*), revisited. *Parasitol. Res* **2010**, *107*, 117–125. [CrossRef] [PubMed]
36. Hodek, I.; Hodková, M. Multiple role of temperature during insect diapause: A review. *Entomol. Exp. Appl.* **1988**, *49*, 153–165. [CrossRef]
37. Härkönen, L.; Kaitala, A. Months of asynchrony in offspring production but synchronous adult emergence: The role of diapause in an ectoparasite's life cycle. *Environ. Entomol.* **2013**, *42*, 1408–1414. [CrossRef] [PubMed]
38. Danks, H.V. *Insect Dormancy: An Ecological Perspective*; Biological Survey of Canada: Ottawa, ON, Canada, 1987; p. 43.
39. Klei, T.R.; Degiusti, D.L. Observations on the bionomics of *Pseudolynchia canariensis* (Diptera: Hippoboscidae). *Parasitology* **1975**, *70*, 195–202. [CrossRef] [PubMed]

40. Sokół, R.; Michalski, M.M. Occurrence of *Hippobosca equina* in Polish primitive horses during the grazing season. *Ann. Parasitol.* **2015**, *61*, 119–124. [PubMed]
41. Moyer, B.R.; Drown, D.M.; Clayton, D.H. Low humidity reduces ectoparasite pressure: Implications for host life history evolution. *Oikos* **2002**, *97*, 223–228. [CrossRef]
42. Bakhtushkina, A.I. Survivability of *Lipoptena cervi* imaginal forms (Diptera, Hippoboscidae). *Ross. Parazitol. Zhurnal* **2018**, *3*, 23–26. [CrossRef]
43. Popov, A.V. The life cycle of louse-flies *Lipoptena cervi* L. and *Stenepteryx hirundinis* L. (Diptera, Hippoboscidae). *Rev. Entomol. URSS* **1965**, *44*, 573–583.
44. Wellington, W.G. Some reactions of muscoid Diptera to changes in atmospheric pressure. *Can. J. Res.* **1946**, *24*, 105–117. [CrossRef]
45. Tichy, H.; Kallina, W. Insect hygroreceptor responses to continuous changes in humidity and air pressure. *J. Neurophysiol.* **2010**, *103*, 3274–3286. [CrossRef] [PubMed]
46. McFarlane, D.J.; Rafter, M.A.; Booth, D.T.; Walter, G.H. Behavioral responses of a tiny insect, the flower thrips *Frankliniella schultzei* Trybom (Thysanoptera, Thripidae), to atmospheric pressure change. *J. Insect Behav.* **2015**, *28*, 473–481. [CrossRef]
47. Paakkonen, T.; Nieminen, P.; Roininen, H.; Mustonen, A.M. Salt licks do not increase local densities of the deer ked, *Lipoptena cervi*, an abundant ectoparasite of cervids. *Med. Vet. Entomol.* **2014**, *28*, 307–313. [CrossRef] [PubMed]
48. Hagemoen, R.I.M.; Reimers, E. Reindeer summer activity pattern in relation to weather and insect harassment. *J. Anim. Ecol.* **2002**, *71*, 883–892. [CrossRef]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

animals

MDPI

Article

Molecular Characterization of *Lipoptena fortisetosa* from Environmental Samples Collected in North-Eastern Poland

Remigiusz Gałęcki [1,*], Xuenan Xuan [2], Tadeusz Bakuła [1] and Jerzy Jaroszewski [3]

[1] Department of Veterinary Prevention and Feed Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 10-719 Olsztyn, Poland; bakta@uwm.edu.pl
[2] National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro 080-8555, Japan; gen@obihiro.ac.jp
[3] Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 10-719 Olsztyn, Poland; jerzyj@uwm.edu.pl
* Correspondence: remigiusz.galecki@uwm.edu.pl

Simple Summary: *Lipoptena fortisetosa* is an invasive, hematophagous insect, which lives on cervids and continues to spread across Europe. The species originated from the Far East and eastern Siberia. Besides wild animals, these ectoparasites can attack humans, companion animals, and livestock. These insects may also play a role in transmitting infectious diseases. The objective of this study was to confirm the presence of *L. fortisetosa* in north-eastern Poland and to characterize the examined population with the use of molecular methods. Deer keds were collected from six natural forests in the region of Warmia and Mazury. DNA of *L. fortisetosa* was extracted and subjected to molecular studies. Two species of deer keds (*Lipoptena cervi* and *L. fortisetosa*) were obtained in each location during field research. There were no differences in the sex distribution of these two ectoparasite species. During the research, more *L. cervi* than *L. fortisetosa* specimens were obtained. The studied insects were very closely related to specimens from Lithuania, the Czech Republic, and Japan. Our study indicates various ectoparasite lineages, and such research contributes to the improvement of basic knowledge on the distribution, genetic structure, and variability of the invasive ked fly *L. fortisetosa*.

Abstract: Recent years have witnessed an increase in the population of *Lipoptena fortisetosa* in Central Europe. The genetic profile of this ectoparasite has not been studied in Poland to date. The aim of the present study was to confirm the presence of *L. fortisetosa* in north-eastern Poland and to characterize the examined population with the use of molecular methods. Deer keds were collected between June and July 2019 in six natural, mixed forests. A fragment of the rRNA 16S gene was used as a marker to identify *L. fortisetosa* by polymerase chain reaction (PCR). DNA samples were sequenced in the last step. Six new locations of *L. fortisetosa* were confirmed. No significant differences were observed in the sex ratios of *L. cervi* and *L. fortisetosa* (*L. cervi* p-value = 0.74; *L. fortisetosa* p-value = 0.65). Significant differences were noted between the total size of *L. cervi* and *L. fortisetosa* populations (p-value < 0.001). The similarity to GenBank sequences ranged from 95.56% to 100%. The obtained nucleotide sequences were very closely related to *L. fortisetosa* sequences from Lithuania, the Czech Republic, and Japan. Molecular analyses revealed considerable genetic diversity, which could indicate that various ectoparasite lineages have spread throughout Europe.

Keywords: deer keds; ectoparasite; Hippoboscidae; PCR; phylogenetics; vector

check for updates

Citation: Gałęcki, R.; Xuan, X.; Bakuła, T.; Jaroszewski, J. Molecular Characterization of *Lipoptena fortisetosa* from Environmental Samples Collected in North-Eastern Poland. *Animals* **2021**, *11*, 1093. https://doi.org/10.3390/ani11041093

Academic Editor: Abdul Jabbar

Received: 24 March 2021
Accepted: 8 April 2021
Published: 12 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Deer keds are hematophagous ectoparasites of birds and mammals. The genus *Lipoptena* consists of 32 species, including *L. capreoli*, *L. cervi*, *L. depressa*, *L. mazamae*, and *L. fortisetosa*, which are of great importance in veterinary medicine. *Lipoptena fortisetosa* has been insufficiently investigated in cervids, despite the Japanese sika deer (*Cervus nippon*)

that is its original host. The parasite also colonizes non-specific hosts, including cattle and humans [1,2]. Deer keds shed wings when they find a definitive host. Hippoboscidae reproduce by adenotrophic viviparity, and their life cycle is influenced mainly by climatic conditions [3,4]. *Lipoptena* spp. bites are painful and may lead to skin inflammation and alopecia [5,6].

There is evidence to suggest that *L. fortisetosa* continues to spread across Europe. The species originated in the Eastern Palearctic, in particular, the Far East and eastern Siberia. *Lipoptena fortisetosa* was first identified in 1965 in Japan by Maa [7]. In Central Europe, this deer ked is considered a cryptogenic species, but it is increasingly classified as an invasive species [8]. *Lipoptena fortisetosa* was first recorded in Europe in the 1960s [9]. Currently, this insect was spotted in several European countries including the Czech Republic [10], Estonia [11], Italy [12,13], Moldova [2], and Slovakia [14]. This ectoparasite was not detected in Poland during a program monitoring the ectoparasite burden of wild animals in 1973–1980 [15]. In Poland, *L. fortisetosa* was first observed in the region of Lower Silesia in the late 1980s [16]. Later, in 2007–2012, *L. fortisetosa* was identified in cervids in northern Poland and in the Tatra Mountains [8,17–20]. In 2017, this ectoparasite was found even in companion animals in central Poland [21].

Lipoptena fortisetosa is a potential vector of infectious diseases. Deer keds can act as carriers of *Bartonella* spp., and the vertical transmission of this pathogen poses a particularly serious problem [22–24]. In recent research, *Bartonella* spp. of Japanese origin were isolated from *L. cervi* in the region of Warmia and Mazury in Poland [22]. According to Szewczyk et al. [22], the isolated *Bartonella* spp. strain had originated from Japanese sika deer that were introduced to Europe, and it was transmitted to the local environment by various vectors. Molecular studies confirmed that the insects harbored genetic material of *Anaplasma phagocytophilum*, *A. ovis*, *Borrelia* spp., *Coxiella*-like bacteria, *Theileria luwenshuni*, *T. ovis*, and *Trypanosoma* spp. [25–31]. Despite the above, little is known about the ectoparasite's ability to transmit pathogens other than *Bartonella* spp. to new hosts.

The observed migration patterns of the analyzed ectoparasites suggest that their geographic range should be monitored because of the potential vectorial capacity of this ectoparasite [32]. Salvetti et al. [12] noted that the geographic distribution of deer keds in Europe should be analyzed for social and environmental implications because *Lipoptena* spp. may cause problems for wildlife management. However, a detailed evaluation of ancestral lineages and migration routes requires larger and more frequent sampling. There is a considerable gap in the genetic distribution of *L. fortisetosa* between Western and Eastern Europe. Andreani et al. [33] did not detect any obvious and stable morphological and molecular differences in specimens from the geographical areas of Asia and Europe. In Italy, they identified the monophyletic clade of *L. fortisetosa*, along with two Central European and two Korean haplotypes [33]. These ectoparasites have been largely neglected in Polish research, and potentially important genetic data, including genetic diversity, are scarce. Most Polish studies of *L. fortisetosa* were based on macroscopic analyses, which is why the genetic and phylogenetic characteristics of the species, including DNA rRNA 16S gene remain unknown. The locations colonized by *L. fortisetosa* in north-eastern Poland have not been evaluated to date [4]. This Polish region abounds in forests, and it is characterized by increasingly frequent deer ked flights and mass attacks on animals and humans. Differences in sex ratios of host-seeking insects were not investigated in this location. This may be important because of the fact that females are more likely to harbor the genetic material of pathogens [32]. The spread of *L. fortisetosa* outside of Asia could have been accelerated by the introduction of sika deer to the European continent, whose small but stable populations can be found in the central part of the region of Silesia and in the eastern part of the region of Warmia and Mazury. The aim of this study was to confirm the occurrence of *L. fortisetosa* in north-eastern Poland and to characterize the specimens collected during host-seeking flights based on the results of molecular analyses.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Collection

The occurrence of *Lipoptena* spp. was monitored in natural mixed forests in the region of Warmia and Mazury in north-eastern Poland. Ectoparasites were monitored in the following municipalities: Ełk (54°19′10.1″ N 22°22′38.7″ E), Gołdap (54°19′10.1″ N 22°22′38.7″ E), Kolno (53°57′34.3″ N 21°04′46.0″ E), Jedwabno (53°28′24.8″ N 20°34′04.9″ E), Pieniężno (54°15′52.1″ N 20°11′14.2″ E), and Ruciane-Nida (53°35′47.4″ N 21°33′13.3″ E). A detailed map of the surveyed region is presented in Figure 1.

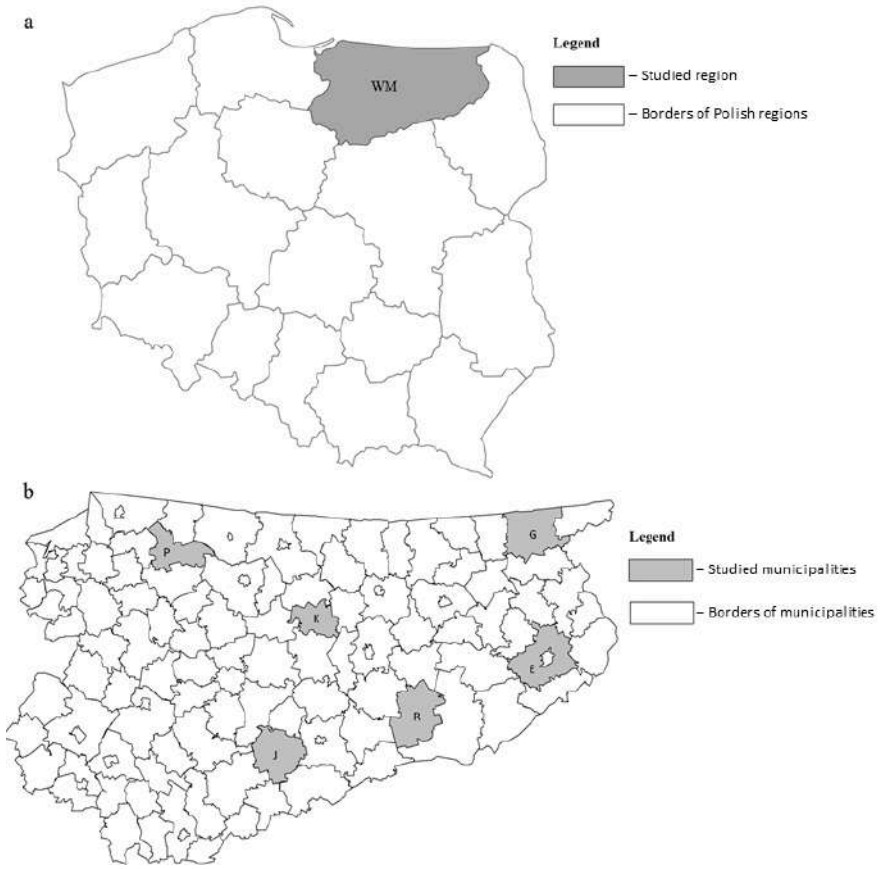


Figure 1. (**a**) Map of Poland and the region of Warmia and Mazury (**b**) with an indication of the municipalities were field studies were performed. Legend: WM = the region of Warmia and Mazury; E = Ełk; G = Gołdap; J = Jedwabno; K = Kolno; P = Pieniężno; R = Ruciane-Nida.

The selected sampling sites are characterized by extensive forests and large cervid populations, including red deer (*Cervus elaphus*), European roe deer (*Capreolus capreolus*), and moose (*Alces alces*). The study was conducted between June and July 2019 between 7 and 10 a.m. This study period was chosen because of a noticeable increase in hippoboscidae activity. The number of *Lipoptena* spp. individuals was expressed by the sum number of winged deer keds that were captured on the investigator's clothing per day. Five daily measurements were conducted in each sampling site. A total of 30 measurements were conducted. The investigator walked through the forest wearing brown cotton clothing covering the entire body. *Lipoptena* spp. were captured immediately after landing on the clothing. During the walk, the investigator checked protective clothing every 20 m and collected insects from creases and folds on the fabric. Keds that escaped were not counted. Similar methods have been used by other researchers to acquire environmental samples of ticks and *Lipoptena* spp. [34,35]. The collected ectoparasites were placed in individual test tubes containing 70% ethanol.

2.2. Species Identification

The collected samples were transported to the Biological Hazard Laboratory at the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn. Species and sex were identified based on morphological features, including body dimensions, wing venation, the length and structure of the palpi, and the number of erect hairs on the mesonotum, under the Leica M165C stereoscopic microscope (Leica, Wetzlar, Germany). Measurements were performed in Leica Application Suite 4.4 (Leica, Wetzlar, Germany) based on the taxonomic keys for *Lipoptena* spp. developed by Borowiec and Maa, and the morphological descriptions provided by Andreani et al. [13,36,37].

2.3. Statistical Analysis

The sex ratio of *Lipoptena* spp. and the number of *L. cervi* and *L. fortisetosa* specimens from each measurement were analyzed with Student's t-test for independent samples. The following statistical parameters were calculated for the analyzed populations of *L. cervi* and *L. fortisetosa* using overall data from daily observations (n = 30): mean (*M*), median (*ME*), standard deviation (*SD*), standard error (*SE*), variance (*V*), minimum (*Min*), and maximum (*Max*). Differences were regarded as statistically significant at p-value < 0.05. Data were processed statistically in Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

2.4. DNA Extraction

Five samples of *L. fortisetosa* (n = 30) from each sampling site were randomly selected for molecular analyses. The representative number of samples was estimated with the use of formulas for computing the minimum sample size to guarantee the reliability of the results (sample size: N_P = number of collected specimens, α = 95%, f = 0.5, e = 15%). Keds were air-dried at room temperature for 15 min, and they were crushed with a sterile rod in sterile Eppendorf tubes. Genomic DNA was extracted from each sample with the Sherlock AX kit (A&A Biotechnology, Poland) according to the manufacturer's instructions. DNA was eluted in 40 µL of Tris-EDTA (TE) buffer, and the concentration of the extract was checked in the Nano Drop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The extracted DNA was stored at −20 °C until analysis.

2.5. Polymerase Chain Reaction

The DNA sequence of the mitochondrial DNA rRNA 16S gene of *L. fortisetosa* with an estimated length of 412-bp was amplified by PCR. The amplification primers were L700F (5′-AAAGTTTAACCTGCCCACTGAT-3′) and L1213R (5′-CTGAACTCAGATCACGTAAGAAT-3′) [22]. The following cycling conditions were applied: initial denaturation at 92 °C for 3 min; 35 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s; annealing at 60 °C for 10 s; extension at 68 °C for 30 s; final extension at 68 °C for 5 min [22]. Each reaction was performed in a final volume of 25 µL containing 2.5 µL of 10× Standard Taq Reaction Buffer (Biolabs, NC, USA), 0.5 µL of 10 mM deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) (Biolabs, USA), 0.5 µL of 10 µM of each primer, 1 µL of *Lipoptena* spp. DNA template, 0.125 µL of Taq DNA Polymerase (Biolabs, NC, USA), and 19.875 µL of double-distilled water. Double-distilled water was the negative control. *Lipoptena cervi* DNA extracted during a previous study was the positive control. PCR products were subjected to electrophoresis on 2% agarose gel. They were stained with ethidium bromide and visualized in a UV transilluminator.

2.6. Sequencing

After PCR, DNA samples were purified by the ethanol precipitation method described by Weinberger [38]. DNA was sequenced with the use of the described primers (L700F/L1213R) and the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the results were analyzed in the ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The acquired nucleotide sequences were edited in the BioEdit program [39] and compared with GenBank sequences in the BLAST-NCBI program (attached in result section). Sequences were aligned with the ClustalW

algorithm. A phylogenetic analysis of rRNA 16S sequences and the corresponding GenBank sequences was performed by the maximum likelihood method and the Tamura–Nei model in MEGA 10.1.17 [40]. Sequences of *L. cervi* served as the outgroup. Model selection was based on Akaike's information criterion (AIC). Bootstrap confidence values for assessing the reliability of branches were calculated in 10,000 replicates.

3. Results

The representative *L. fortisetosa* sequences were deposited in the GenBank database of the National Center for Biotechnology with the BankIt tool under accession numbers MT182645-MT182661, MT182663.

A total of 482 *Lipoptena* spp. specimens ($M = 80.33$; $ME = 79.5$; $SD = 12.39$; $SE = 5.06$; $V = 15.43$; $Min = 61$; $Max = 96$) were collected in sampling sites. Of those, 385 were identified as *L. cervi* ($M = 64.17$; $ME = 67$; $SD = 9.26$; $SE = 3.78$; $V = 14.43$; $Min = 47$; $Max = 72$), including 196 females (50.9%) and 189 males (49.1%). No significant differences in the sex ratio were noted in *L. cervi* (p-value = 0.74). *Lipoptena fortisetosa* was recorded in all six locations. Ninety-seven individuals were identified as *L. fortisetosa* ($M = 16.17$; $ME = 15.5$; $SD = 5.53$; $SE = 2.56$; $V = 34.20$; $Min = 8$; $Max = 24$), including 51 females (52.58%) and 46 males (47.42%). No significant differences in the sex ratio were found (p-value = 0.65). The overall populations of *L. cervi* and *L. fortisetosa* from studied locations differed significantly in size (p-value < 0.001). The results are presented in detail in Table 1.

Table 1. Number of deer keds collected in sampling sites, with a division into species and sexes.

Sampling Site	*Lipoptena cervi*		*Lipoptena fortisetosa*		Total
	♂	♀	♂	♀	
Ełk	28	39	3	5	75
Gołdap	29	32	7	10	78
Jedwabno	34	33	6	8	81
Kolno	40	32	14	10	96
Pieniężno	20	27	7	7	61
Ruciane-Nida	38	33	9	11	91

Legend: ♂= male; ♀= female.

The phylogenetic tree is presented in Figure 2. The length of the alignment used to build the phylogeny was 445-bp. Twenty-eight sequences (MT182645-MT182658, MT182660-MT182661, MT182663) were characterized by 98.32% to 100% similarity with *L. fortisetosa* sequences from the Czech Republic and Lithuania (MF495939, MN889549). The similarity between sequences MT182659 and the *L. fortisetosa* sequence from Japan (AB632589) reached 95.56%. Detailed data, including the ID of the closest match, country of origin, and percent sequence identity, are presented in Table 2. The distribution of sequences in each sampling site is presented in Table 3.

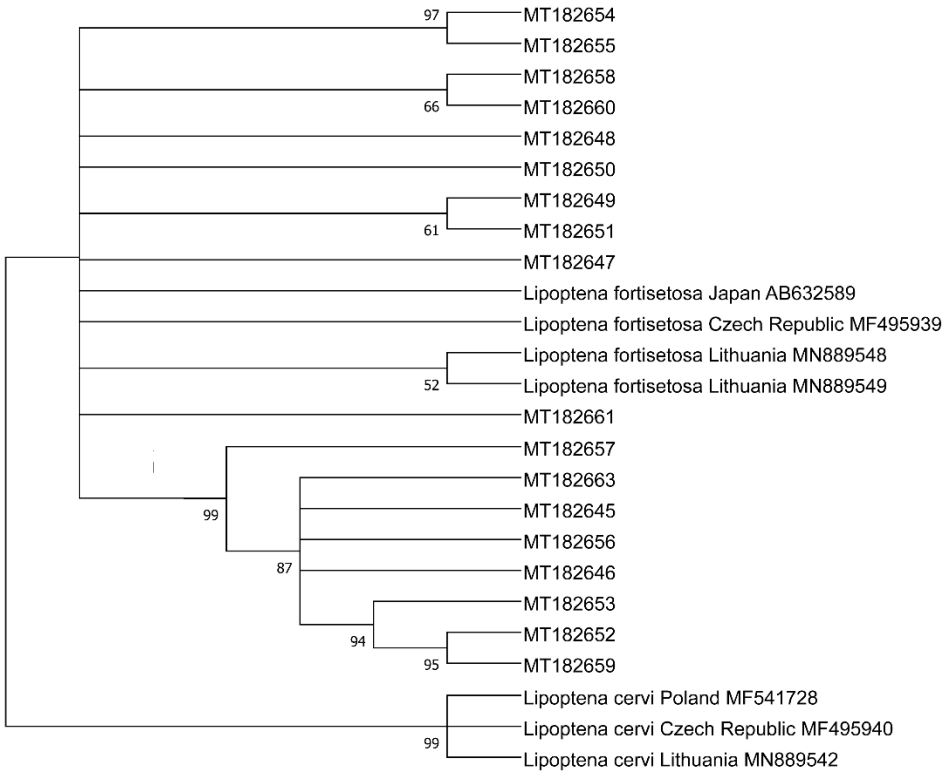


Figure 2. Phylogenetic analysis of the rRNA 16S gene in *Lipoptena fortisetosa*. Legend: phylogenetic tree based on the results of the maximum likelihood analysis of a fragment of the rRNA 16S gene in *Lipoptena fortisetosa*. The identified unique haplotypes are labeled with sequence identification numbers. The reference sequences from GenBank are indicated in the tree. Bootstrap confidence values for assessing the reliability of branches were calculated in 10,000 replicates.

Table 2. Comparison of the acquired sequences with GenBank sequences.

Sequence ID	Closest Match ID	Country of Origin	Percentage Match	Reference
MT182645	MF495939 MN889549	Czech Republic Lithuania	99.56%	Radzijevskaja et al. [41] Sochova et al. [42]
MT182646			99.78%	
MT182647			98.68%	
MT182648			99.58%	
MT182649			99.36%	
MT182650			99.58%	
MT182651			100%	
MT182652			98.32%	
MT182653			99.04%	
MT182654			98.93%	
MT182655			98.93%	
MT182656			98.91%	
MT182657			98.43%	
MT182658			99.36%	
MT182659	AB632589	Japan	95.56 %	Hosokawa et al. [43]
MT182660	MF495939 MN889549	Czech Republic Lithuania	99.36%	Radzijevskaja et al. [41] Sochova et al. [42]
MT182661			99.15%	
MT182663			98.91%	

Table 3. Molecular characteristics of *Lipoptena fortisetosa* in sampling sites.

	Number of *Lipoptena fortisetosa* Specimens					
Sampling Site	**Ełk (n = 5)**	**Gołdap (n = 5)**	**Jedwabno (n = 5)**	**Kolno (n = 5)**	**Pieniężno (n = 5)**	**Ruciane-Nida (n = 5)**
MT182645	2	-	-	-	-	-
MT182646	1	-	-	-	-	-
MT182647	1	1	-	1	-	-
MT182648	1	-	-	-	-	-
MT182649	-	1	-	-	-	-
MT182650	-	1	-	-	-	-
MT182651	-	1	-	1	-	-
MT182652	-	-	1	-	-	-
MT182653	-	-	1	-	-	2
MT182654	-	-	1	-	-	1
MT182655	-	-	1	-	-	1
MT182656	-	-	-	1	1	-
MT182657	-	1	-	1	-	-
MT182658	-	-	1	1	1	-
MT182659	-	-	-	-	1	-
MT182660	-	-	-	-	1	-
MT182661	-	-	-	-	1	-
MT182663	-	-	-	-	-	1

4. Discussion

Autochthonous *L. cervi* accounted for 79.88% of the collected ked samples, which suggests that it is the dominant species in the region of Warmia and Mazury. However, the proportions of *Lipoptena* species should be regularly monitored in the studied region because of the possible increase in the population of *L. fortisetosa*. In Europe, *L. fortisetosa* is considered a multivoltine species, whereas *L. cervi* is regarded as a univoltine species [8]. The phenomena described above could influence the rate at which these ectoparasite populations develop in the future, and it could increase the number of host-seeking *L. fortisetosa*. Because of phenological differences between the species, the number of collected individuals can also be influenced by the month of sampling. Both ectoparasites species should be sampled in a period when they are most active. This study demonstrated that adult *L. fortisetosa* and *L. cervi* are active in the same period of time, and similar observations were made by Oboňa et al. [14]. Neither species was characterized by significant differences in the sex ratio. In around 30% of ectoparasitic species, the sex ratio does not significantly depart from unity [44]. Adult keds find hosts immediately after emergence. However, the sex ratio of *Lipoptena*-spp.-inhabiting hosts could differ from that noted in this study because of a potentially shorter life span of adult males [44].

The migration patterns of *Lipoptena* spp. in Europe have not been fully elucidated, but the geographic range of these ectoparasites was probably expanded by natural migration from the east. It cannot be ruled out that this insect may have been brought to Europe along with imported animals [33]. *Lipoptena fortisetosa* had been previously identified in only several European countries, including the Czech Republic [10], Moldova [2], and Poland [4,8]. Recent reports from Estonia [11] and Italy [12,13,33] indicate that the geographic range of *Lipoptena* spp. has expanded both northward and southward since 2017. Andreani et al. [33] suggested that the relatively recent migration of sika or hybrid individuals to Italy from neighboring countries may have contributed to the ectoparasite transmission. There is no conclusive evidence to indicate whether this geographic shift has resulted from an increase in the cervid population or climate change. The impact of global climate change on the geographic expansion of *Lipoptena* spp. was postulated by Kurina et al. [11]. Keds are poor fliers that cover a distance of only up to 50 m when searching for hosts [45], which is why hosts play an important role in the transmission of these ectoparasites. The presence of

L. fortisetosa in highly diverse regions also suggests that these insects are eurytopic species that tolerate a wide range of environmental conditions [4,46].

The importance of *Lipoptena* spp. in veterinary medicine has not been fully established, which is why these ectoparasites should be studied in greater detail. The existing knowledge about the impact of *L. fortisetosa* on wild animals is superficial, and these ectoparasites could affect game management in the future. Polish cervids and other wild animals were found to be heavily infested with hippoboscids. Deer keds were detected in 64% of European roe deer [47], 76% of fallow deer, and 78% of European red deer [48]. One animal was infested with 9.9 insects on average [48]. Vikøren et al. [49] found that one moose can carry more than 16,000 keds. Andreani et al. [33] detected infestation of European deer species by *L. fortisetosa*. The stability of the *L. fortisetosa* population can be attributed to adaptive genetic variation and the benefits associated with colonizing different cervid species as hosts. These observations point to high plasticity in host selection, which is influenced by the availability and population density of a given host species. For this reason, there are no obvious barriers to the future expansion of the discussed ectoparasites [11,33].

The available GenBank data show that the sequences originating from the Czech Republic or Lithuania (cited in the manuscript) were closely similar to ours. However, the GenBank database contains only several 16S rRNA sequences of European *L. fortisetosa*. Sequence MT182659, obtained in the present study, was most similar to the sequence originating from Japan (AB632589) [43]. The insect harboring the above sequence was captured in the municipality of Pieniężno where a stable population of sika deer has existed since the beginning of the 20th century. *Lipoptena fortisetosa* could have been accidentally introduced to that region by sika deer, and a distinct population of these ectoparasites could have evolved over time. Similar conclusions were formulated by Andreani et al. [33] and Mihalca et al. [50]. Interestingly, two Korean haplotypes of this insect were detected in Italy [33]. This confirmed our assumptions. Polish deer keds could belong to an isolated and genetically diverse population. The genetic polymorphism of *L. fortisetosa* is probably associated with the segregation of haplotypes that are relatively popular in this species, and the stability of the *L. fortisetosa* population points to the presence of dynamic evolutionary mechanisms.

Similar levels of genetic diversity were reported in a study carried out on *L. mazamae* [51]. Trout et al. [51] identified six unique haplotypes using 30 DNA sequences of a 259-bp region of the mitochondrial DNA rRNA 16S gene amplified by PCR. Such molecular differences were also reported in other ectoparasites, including *Cimex lectularius*, tsetse flies (*Glossina* spp.), and ticks [52–55]. Szalanski et al. [52] observed high mitochondrial DNA diversity with moderate to high levels of gene flow in *C. lectularius*. Krafsur et al. [53] identified 26 haplotypes in tsetse flies with the use of 12S rRNA and 16S rRNA markers, where most haplotypes occurred only once or twice. Only six haplotypes were identified in the same locations [53]. 16S rRNA and Cytochrome c oxidase I (COI) gene sequences are also useful markers for analyzing genetic polymorphism in ticks and for identifying and differentiating the populations of *Dermacentor nuttalli*, *Ixodes persulcatus*, and *I. pavlovskyi* [54,55]. These findings indicate that the mitochondrial DNA rRNA 16S gene can be reliably used to study the population genetics of ectoparasites. Previous research has demonstrated that *Lipoptena* spp. could be paraphyletic; therefore, further research is needed to explore the genetic variation and taxonomy among this genus [56]. Kurina et al. [11] and Andreani [33] found that the COI sequences of *L. fortisetosa* deposited in GenBank are genetically diverse and have different geographic lineages in Europe. Similar conclusions can be formulated based on the results of this study.

The current study revealed considerable genetic diversity of *L. fortisetosa* in six sampling sites in the region of Warmia and Mazury, which indicates that the genetic structure of its population is far more complex than previously thought. Several genetically distinct original populations probably migrated or were introduced to Europe. The present findings suggest that a decrease in deer ked populations in forests could contribute to their diversity. The presence of progressive evolutionary mechanisms indicates that *L. fortisetosa* could

further adapt to the environmental conditions of Central Europe [4]. *Lipoptena fortisetosa* is an invasive species that strongly competes for hosts with the native population of *L. cervi*, which could influence the size of both insect populations in the future. Further genetic analyses of louse flies, combined with pathogen detection, are needed to identify areas with a potentially high risk of infectious disease transmission by *L. fortisetosa* [51]. The structure of deer ked populations should be analyzed in greater detail to adequately manage and protect wild animals and to monitor the transmission of pathogens between distant regions. The identification of *Bartonella* spp. of Japanese origin by Szewczyk et al. [22] and *L. fortisetosa* of Japanese origin in this study demonstrates how the dispersion of deer keds in the environment can contribute to the spread of infectious diseases transmitted by these vectors. The results of this study provide additional evidence that *L. fortisetosa* populations in Central Europe have different genetic lineages. Detailed genetic characterization of deer keds in Central Europe will enable researchers to track and predict the spread of *L. fortisetosa*. Migrations to new areas should encourage new research into the dynamics and genetics of *L. fortisetosa* populations because, according to Kurina et al. [11], a thorough understanding of the distribution and bionomics of this invasive migratory species is crucial for its effective control in Europe.

5. Conclusions

The results of the present study and previous research suggest that *L. fortisetosa* has formed stable and genetically diverse populations throughout Poland. The population genetics of *L. fortisetosa* should be further explored to track the migration of these ectoparasites to Northern and Western Europe. The occurrence of *L. fortisetosa* should be regularly monitored to detect an increase in the number of individuals in the total deer ked population. Further research is needed to detect new locations and analyze the genetic lineages of *L. fortisetosa*. The sequences identified in this study indicate that the population of *L. fortisetosa* continues to spread despite geographic limitations.

Author Contributions: Conceptualization, R.G.; methodology, R.G.; software, R.G.; validation, R.G.; formal analysis, R.G.; investigation, R.G.; resources, R.G.; data curation, R.G.; writing—original draft preparation, R.G.; writing—review and editing, R.G., J.J., X.X., and T.B.; visualization, R.G.; supervision, J.J., X.X., and T.B.; project administration, R.G.; funding acquisition, R.G., J.J., and T.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project was financially co-supported by the Ministry of Science and Higher Education under the program entitled Regional Initiative of Excellence for the years 2019–2022 (project no. 010/RID/2018/19; amount of funding PLN 12,000,000). The funders had no role in the study design, the data collection and analysis, the decision to publish, or the preparation of the manuscript.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data generated or analyzed during this study are presented in this paper.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Healthy Animal-Safe Food Scientific Consortium of the Leading National Research Center (KNOW) (grant No. 05-1/KNOW2/2015) for supporting cooperation between the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn and the National Research Center for Protozoan Diseases of the Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Schumann, H.; Messner, B. Erstnachweis von *Lipoptena fortisetosa* Maa, 1965 in Deutschland (Dipt., Hippoboscidae). *Entomol. Nachr. Ber.* **1993**, *37*, 247–249.
2. Metelitsa, A.K.; Veselkin, G.A. Parasitism of the louse fly *Lipoptena fortisetosa* on cattle. *Parazitologiia* **1989**, *23*, 276–277. [PubMed]
3. McAlpine, J.F. *Manual of Nearctic Diptera*; Research Branch, Agriculture Canada: Ottawa, ON, Canada, 1987; Volume 2, pp. 1271–1332.

4. Gałęcki, R.; Jaroszewski, J.; Xuan, X.; Bakuła, T. Temporal-Microclimatic Factors Affect the Phenology of *Lipoptena fortisetosa* in Central European Forests. *Animals* **2020**, *10*, 2012. [CrossRef] [PubMed]
5. Buczek, W.; Buczek, A.M.; Bartosik, K.; Buczek, A. Comparison of skin lesions caused by *Ixodes ricinus* ticks and *Lipoptena cervi* deer keds infesting humans in the natural environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 3316. [CrossRef] [PubMed]
6. Madslien, K.; Ytrehus, B.; Vikøren, T.; Malmsten, J.; Isaksen, K.; Hygen, H.O.; Solberg, E.J. Hair-loss epizootic in moose (*Alces alces*) associated with massive deer ked (*Lipoptena cervi*) infestation. *J. Wildl. Dis.* **2011**, *47*, 893–906. [CrossRef]
7. Maa, T.C. A synopsis of the Lipopteninae. *J. Med. Entomol.* **1965**, *2*, 233–248. [CrossRef]
8. Kowal, J.; Nosal, P.; Kornaś, S.; Wajdzik, M.; Matysek, M.; Basiaga, M. Biodiversity and importance of hippoboscids infection in cervids. *Med. Weter.* **2016**, *72*, 745–749.
9. Theodor, O. *Lipoptena parvula*, n. sp. eine neue Art aus der Tschechoslowakei (Diptera, Hippoboscidae). *Acta Entomol. Mus. Nat. Pra.* **1967**, *37*, 275–278.
10. Zeman, P. Borrelia-infection rates in tick and insect vectors accompanying human risk of acquiring Lyme borreliosis in a highly endemic region in Central Europe. *Folia Parasitol.* **1998**, *45*, 319–325.
11. Kurina, O.; Kirik, H.; Õunap, H.; Õunap, E. The northernmost record of a blood-sucking ectoparasite, *Lipoptena fortisetosa* Maa (Diptera: Hippoboscidae), in Estonia. *Biodivers. Data J.* **2019**, *7*, e47857. [CrossRef] [PubMed]
12. Salvetti, M.; Bianchi, A.; Marangi, M.; Barlaam, A.; Giacomelli, S.; Bertoletti, I.; Roy, L.; Giangaspero, A. Deer keds on wild ungulates in northern Italy, with a taxonomic key for the identification of spp. of Europe. *Med. Vet. Entomol.* **2020**, *34*, 74–85. [CrossRef]
13. Andreani, A.; Sacchetti, P.; Belcari, A. Comparative morphology of the deer ked *Lipoptena fortisetosa* first recorded from Italy. *Med. Vet. Entomol.* **2019**, *33*, 140–153. [CrossRef]
14. Oboňa, J.; Sychra, O.; Greš, S.; Heřman, P.; Manko, P.; Roháček, J.; Šestáková, A.; Šlapák, J.; Hromada, M. A revised annotated checklist of louse flies (Diptera, Hippoboscidae) from Slovakia. *ZooKeys* **2019**, *862*, 129–152. [CrossRef]
15. Kadulski, S. *Występowanie Stawonogów Pasożytniczych na Łownych Lagomorpha i Artiodactyla—Próba Syntezy*; Rozprawy i Monografie 132; Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego: Gdańsk, Poland, 1989; pp. 1–140.
16. Borowiec, L.; Zatwarnicki, T. Lipoptena fortisetosa Maa, 1965 (Diptera, Hippoboscidae), nowy gatunek dla fauny Polski. *Prz. Zool.* **1989**, *33*, 579–582.
17. Kowal, J.; Nosal, P.; Rościszewska, M.; Matysek, M. New records of *Lipoptena fortisetosa* Maa, 1965 (Diptera:Hippoboscidae) in Poland. *Dipteron* **2009**, *25*, 27–29.
18. Cydzik, K.; Kadulski, S. *Parasitic Insects of the Red Deer (Cervus elaphus L.) in Northeastern Poland*; Stawonogi. Inwazje i ich ograniczanie; Akapit: Lublin, Poland, 2009; pp. 113–115.
19. Jędrysik, D.; Kadulski, S. *Parasitic Arthropods of Roe Deer Capreolus capreolus (L.) of the Region of Pojezierze Południowobałtyckie (The Southern Baltic Lake District)*; Arthropods. The Medical and Economic Importance; Akapit: Lublin, Poland, 2012; pp. 95–103.
20. Matysek, M.; Kowal, J. Dwa nowe gatunki muchówek. *Tatry* **2014**, *48*, 64–65.
21. Sokół, R.; Gałęcki, R. Prevalence of keds on city dogs in central Poland. *Med. Vet. Entomol.* **2017**, *31*, 114–116. [CrossRef] [PubMed]
22. Szewczyk, T.; Werszko, J.; Steiner-Bogdaszewska, Ż.; Jeżewski, W.; Laskowski, Z.; Karbowiak, G. Molecular detection of *Bartonella* spp. in deer ked (*Lipoptena cervi*) in Poland. *Parasit. Vectors* **2017**, *10*, 487. [CrossRef]
23. De Bruin, A.; Van Leeuwen, A.D.; Jahfari, S.; Takken, W.; Földvári, M.; Dremmel, L.; Sprong, H.; Földvári, G. Vertical transmission of *Bartonella schoenbuchensis* in *Lipoptena cervi*. *Parasit. Vectors* **2015**, *8*, 176. [CrossRef]
24. Korhonen, E.M.; Vera, C.P.; Pulliainen, A.T.; Sironen, T.; Aaltonen, K.; Kortet, R.; Härkönen, L.; Härkönen, S.; Paakkonen, T.; Nieminen, P.; et al. Molecular detection of *Bartonella* spp. in deer ked pupae, adult keds and moose blood in Finland. *Epidemiol. Infect.* **2015**, *143*, 578–585. [CrossRef] [PubMed]
25. Lee, S.H.; Kim, K.T.; Kwon, O.D.; Ock, Y.; Kim, T.; Choi, D.; Kwak, D. Novel detection of *Coxiella* spp., *Theileria luwenshuni*, and *T. ovis* endosymbionts in deer keds (*Lipoptena fortisetosa*). *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0156727. [CrossRef]
26. Doby, J.M.; Bigaignon, G.; Degeilh, B.; Guiguen, C. Ectoparasites of large wild mammals (deer and wild boars) and Lyme borreliosis. Search for *Borrelia burgdorferi* in more than 1400 ticks, lice, Pupipara Diptera and fleas. *Rev. Med. Vet.* **1994**, *145*, 743–748.
27. Hulinsky, V.; Smetana, K. Molecular and microscopical evidence of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in patients, animals and ticks in the Czech Republic. *Microbiologica* **2002**, *25*, 437–448.
28. Lane, R.S.; Mun, J.; Parker, J.M.; White, M. Columbian black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*) as hosts for *Borrelia* spp. in northern California. *J. Wildl. Dis.* **2005**, *41*, 115–125. [CrossRef] [PubMed]
29. Böse, R.; Petersen, K. *Lipoptena cervi* (Diptera), a potential vector of Megatrypanum trypanosomes of deer (Cervidae). *Parasitol. Res.* **1991**, *77*, 723–725. [CrossRef] [PubMed]
30. Hornok, S.; De La Fuente, J.; Biró, N.; Fernández de Mera, I.G.; Meli, M.L.; Elek, V.; Gönczi, E.; Meili, T.; Tánczos, B.; Farkas, R.; et al. First molecular evidence of *Anaplasma ovis* and *Rickettsia* spp. in keds (Diptera: Hippoboscidae) of sheep and wild ruminants. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2011**, *11*, 1319–1321. [CrossRef]
31. Víchová, B.; Majláthová, V.; Nováková, M.; Majláth, I.; Čurlík, J.; Bona, M.; Komjáti-Nagyová, M.; Peťko, B. PCR detection of re-emerging tick-borne pathogen, Anaplasma phagocytophilum, in deer ked (*Lipoptena cervi*) a blood-sucking ectoparasite of cervids. *Biologia* **2011**, *66*, 1082. [CrossRef]

32. Gałęcki, R.; Jaroszewski, J.; Bakuła, T.; Galon, E.M.; Xuan, X. Molecular Detection of Selected Pathogens with Zoonotic Potential in Deer Keds (*Lipoptena fortisetosa*). *Pathogens* **2021**, *10*, 324. [CrossRef]
33. Andreani, A.; Giangaspero, A.; Marangi, M.; Barlaam, A.; Ponzetta, M.P.; Roy, L.; Belcari, A.; Sacchetti, P. Asia and Europe: So Distant So Close? The Case of *Lipoptena fortisetosa* in Italy. *Korean J. Parasitol.* **2020**, *58*, 661–668. [CrossRef]
34. Mysterud, A.; Madslien, K.; Herland, A.; Viljugrein, H.; Ytrehus, B. Phenology of deer ked (*Lipoptena cervi*) host-seeking flight activity and its relationship with prevailing autumn weather. *Parasit. Vectors* **2016**, *9*, 95. [CrossRef]
35. Ginsberg, H.S.; Ewing, C.P. Comparison of flagging, walking, trapping, and collecting from hosts as sampling methods for northern deer ticks, *Ixodes dammini*, and lone-star ticks, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* **1989**, *7*, 313–322. [CrossRef] [PubMed]
36. Borowiec, L. *Klucze do Oznaczania Owadów Polski*; Część XXVIII. Muchówki-Diptera. Zeszyt 77, Wpleszczowate-Hippoboscidae; Państwowe Wydawnictwo Naukowe: Warsaw, Poland, 1984; pp. 3–35.
37. Maa, T.C. A revised checklist and concise host index of Hippoboscidae (Diptera). *Pac. Insects Monogr.* **1969**, *20*, 261–299.
38. Weinberger, R. *Practical Capillary Electrophoresis*; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2000; pp. 423–457.
39. Hall, T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1999**, *41*, 95–98.
40. Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Available online: https://www.megasoftware.net (accessed on 3 September 2019).
41. Radzijevskaja, J.; Paulauskas, A.; Klepeckiene, K.; Razanske, I.; Rosef, O. Species Diversity and Molecular Characterization of Deer Keds (Genus Lipoptena) from Cervids. Unpublished. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN889549 (accessed on 2 February 2020).
42. Šochová, E.; Husník, F.; Nováková, E.; Halajian, A.; Hypša, V. *Arsenophonus* and *Sodalis* replacements shape evolution of symbiosis in louse flies. *PeerJ* **2017**, *5*, e4099. [CrossRef] [PubMed]
43. Hosokawa, T.; Nikoh, N.; Koga, R.; Satô, M.; Tanahashi, M.; Meng, X.Y.; Fukatsu, T. Reductive genome evolution, host–symbiont co-speciation and uterine transmission of endosymbiotic bacteria in bat flies. *ISME J.* **2012**, *6*, 577–587. [CrossRef] [PubMed]
44. Marshall, A.G. The sex ratio in ectoparasitic insects. *Ecol. Entomol.* **1981**, *6*, 155–174. [CrossRef]
45. Paakkonen, T. Ecophysiology of the Deer Ked (*Lipoptena cervi*) and Its Hosts. Ph.D. Thesis, University of Eastern Finland, Joensuu, Finland, 2012. Available online: https://core.ac.uk/download/pdf/15169155.pdf (accessed on 23 April 2020).
46. Barrows, E.M. *Animal Behavior Desk Reference: A Dictionary of Animal Behavior, Ecology, and Evolution*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2011; p. 72.
47. Kadulski, S. Ectoparasites of Cervidae in north-east Poland. *Acta Parasitol.* **1996**, *41*, 204–210.
48. Szczurek, B.; Kadulski, S. Ectoparasites on fallow deer, *Dama dama* (L.) in Pomerania, Poland. *Acta Parasitol.* **2004**, *49*, 80–86.
49. Vikøren, T.; Lillehaug, A.; Handeland, K. *Helseovervakingsprogrammet for Hjortevilt (HOP)*; Årsrapport for 2006 og 2007, Report Series; National Veterinary Inst.: Oslo, Norway, 2008.
50. Mihalca, A.D.; Păstrav, I.R.; Sándor, A.D.; Deak, G.; Gherman, C.M.; Sarmaşi, A.; Votýpka, J. First report of the dog louse fly *Hippobosca longipennis* in Romania. *Med. Vet. Entomol.* **2019**, *33*, 530–535. [CrossRef]
51. Trout, R.T.; Steelman, C.D.; Szalanski, A.L. Phylogenetics and population genetics of the louse fly, *Lipoptena mazamae*, from Arkansas, USA. *Med. Vet. Entomol.* **2010**, *24*, 258–265. [PubMed]
52. Szalanski, A.L.; Austin, J.W.; McKern, J.A.; Steelman, C.D.; Gold, R.E. Mitochondrial and ribosomal internal transcribed spacer (ITS1) diversity of the bed *bug Cimex lectularius* L. (Heteroptera: Cimicidae). *J. Med. Entomol.* **2008**, *45*, 229–236. [CrossRef]
53. Krafsur, E.S.; Madsen, M.; Wohlford, D.L.; Mihok, S.; Griffiths, N.T. Population genetics *of Glossina morsitans submorsitans* (Diptera: Glossinidae). *Bull. Entomol. Res.* **2000**, *90*, 329–335. [CrossRef]
54. Kulakova, N.V.; Khasnatinov, M.A.; Sidorova, E.A.; Adel'shin, R.V.; Belikov, S.I. Molecular identification and phylogeny of Dermacentor nuttalli (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* **2014**, *113*, 1787–1793. [CrossRef] [PubMed]
55. Livanova, N.N.; Tikunov, A.Y.; Kurilshikov, A.M.; Livanov, S.G.; Fomenko, N.V.; Taranenko, D.E.; Kvashnina, A.E.; Tikunova, N.V. Genetic diversity of *Ixodes pavlovskyi* and *I. persulcatus* (Acari: Ixodidae) from the sympatric zone in the south of Western Siberia and Kazakhstan. *Exp. Appl. Acarol.* **2015**, *67*, 441–456. [CrossRef] [PubMed]
56. Peterson, F.T.; Meier, R.; Kutty, S.N.; Wiegmann, B.M. The phylogeny and evolution of host choice in the Hippoboscoidea (Diptera) as reconstructed using four molecular markers. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2007**, *45*, 111–122. [CrossRef] [PubMed]

pathogens

MDPI

Article

Molecular Detection of Selected Pathogens with Zoonotic Potential in Deer Keds (*Lipoptena fortisetosa*)

Remigiusz Gałęcki [1,*], Jerzy Jaroszewski [2], Tadeusz Bakuła [1], Eloiza M. Galon [3] and Xuenan Xuan [3]

[1] Department of Veterinary Prevention and Feed Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 10-719 Olsztyn, Poland; bakta@uwm.edu.pl
[2] Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 10-719 Olsztyn, Poland; jerzyj@uwm.edu.pl
[3] National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro 080-8555, Japan; eloizagalon@gmail.com (E.M.G.); gen@obihiro.ac.jp (X.X.)
* Correspondence: remigiusz.galecki@uwm.edu.pl

Abstract: Deer keds are obligatory hematophagous ectoparasites of birds and mammals. Cervids serve as specific hosts for these insects. However, ked infestations have been observed in non-specific hosts, including humans, companion animals, and livestock. *Lipoptena fortisetosa* is a weakly studied ectoparasite, but there is evidence to indicate that it continues to spread across Europe. The existing knowledge on deer keds' impact on wildlife is superficial, and their veterinary importance is enigmatic. *Lipoptena fortisetosa* is a species with vectorial capacity, but potential pathogen transmission has not been assessed. The objective of this study was to evaluate the prevalence of selected pathogens in *L. fortisetosa* collected from cervids and host-seeking individuals in the environment. Out of 500 acquired samples, 307 (61.4%) had genetic material from at least one tested pathogen. Our research suggests that *L. fortisetosa* may be a potential vector of several pathogens, including *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Borellia* spp., *Coxiella*-like endosymbionts, *Francisiella tularensis*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia* spp., and *Theileria* spp.; however, further, more extensive investigations are required to confirm this. The results of the study indicate that keds can be used as biological markers for investigating the prevalence of vector-borne diseases in the population of free-ranging cervids.

Keywords: deer keds; ectoparasite; Hippoboscidae; louse flies; PCR; vector; infectious diseases; vector-borne diseases

check for updates

Citation: Gałęcki, R.; Jaroszewski, J.; Bakuła, T.; Galon, E.M.; Xuan, X. Molecular Detection of Selected Pathogens with Zoonotic Potential in Deer Keds (*Lipoptena fortisetosa*). *Pathogens* **2021**, *10*, 324. https://doi.org/10.3390/pathogens10030324

Academic Editor: Alfonso Zecconi

Received: 31 January 2021
Accepted: 7 March 2021
Published: 10 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The role of vectors in the transmission of infectious diseases has been researched extensively in recent years. The main arthropods with vector capacity are ticks, mosquitos, black flies, fleas and lice. Many indigenous insects with vector capacity have not been thoroughly investigated in Europe [1–3]. One of the most underestimated ectoparasites is the deer ked.

Deer keds (syn. louse flies) of the genus Lipoptena (family Hippoboscidae) are potential vectors of infectious diseases that have not been thoroughly studied to date [4]. Special attention should be paid to *Lipoptena fortisetosa*, an invasive species that continues to spread across Europe. *Lipoptena fortisetosa* is a blood-feeding ectoparasite that specifically targets cervids, including the sika deer (*Cervus nippon*), Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*), and roe deer (*Capreolus capreolus*). This parasite also uses the red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and moose (*Alces alces*) [5]. *Lipoptena fortisetosa* originates from eastern Siberia and the Far East [6]. The species was first described by Maa in Japan [6]. In Poland, *L. fortisetosa* was first identified in the region of Lower Silesia in the late 1980s, and its presence was confirmed in the Tatra Mountains and in northern Poland in 2007–2012 [5,7–12]. This ectoparasite was also isolated in the region of Wielkopolska in 2017 [13]. Deer keds

target forest animals during host-seeking flights [14]. The duration of the host-seeking period is determined by the local microclimate and the insect's phenology [14]. Louse flies shed wings when they find a definitive host. They are highly mobile on the host's skin [15]. Deer keds reproduce by adenotrophic viviparity. The prevalence of *Lipoptena* spp. infestations in specific hosts ranges from 64% to 78%, depending on the species [16,17]. These ectoparasites were also identified in non-specific hosts. *Lipoptena fortisetosa* has been isolated from dogs [13]. Izdebska [18] confirmed the presence of *Lipoptena* spp. in bison (*Bison bonasus*). Deer keds were also found to attack cattle and horses [19,20]. Louse fly attacks and bites have also been reported in humans [21–23]. A single host can be infested by up to 16,000 insects [24]. Bites of the *Lipoptena* spp. may cause acute to chronic, eosinophilic to lymphocytic deer ked dermatitis [25]. Other infection symptoms include loss of hair, allergic rhinitis, conjunctivitis, or even anaphylactic shock [25–28].

Vectors are part of the One Health concept because they are responsible for the transmission of pathogens between wildlife, livestock, companion animals and humans [29,30]. Pathogens carried by arthropods cause vector-borne diseases. Vectors can carry viruses, bacteria, protozoa and helmints. Vector-borne viruses include, among others, the Chikungunya virus, bluetongue disease virus, dengue virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, West Nile virus, hantavirus, and Zika virus. The following bacteria are also transmitted by vectors: *Anaplasma* spp., *Bacillus* spp., *Bartonella* spp., *Borellia* spp., *Brucella* spp., *Clostridium* spp., *Coxiella* spp., *Erysipelothrix* spp., *Francisella* spp., *Leptospira* spp., *Listeria* spp., *Mycoplasma* spp., *Pasteurella* spp., *Rickettsia* spp., *Salmonella* spp., and *Yersinia* spp. Vectors also play a very important role in the life cycle of protozoa, including *Babesia* spp., *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp., *Theileria* spp., and *Trypanosoma* spp. Similarly to other flies of the family Hippoboscidae [31], *L. fortisetosa* are potential vectors of infectious diseases [4,32]. DNA of *Coxiella* spp., *Theileria luwenshuni*, and *T. ovis* have been identified in *L. fortisetosa* in molecular analysis [33]. *Lipoptena fortisetosa* can also act as a vector for *Trypanosoma* spp. [34]. Trypanosome DNA was detected in 20% of *L. cervi* and in 48.64% of *L. fortisetosa* [35]. Deer keds harbored genetic material of *Anaplasma* spp. and *Rickettsia* spp. [36,37]. In isolated cases, DNA of *Borrelia* spp. was identified in louse flies [38,39]. The prevalence of *Bartonella* spp., which is transmitted vertically in deer keds, has been widely researched [40–43]. These pathogens' DNA was found in up to 98% of louse flies [42,43].

The European population of *L. fortisetosa* continues to spread, and further research is needed to evaluate this ectoparasite's role in the spread of infectious diseases. The expansion of the insect's geographic range was confirmed by Italian and Estonian studies [44,45]. The existing research is largely based on single detections of the pathogen's genetic material. Most of the research was conducted in small and limited locations. Louse flies' impact on wildlife populations, livestock, companion animals and humans has not been fully elucidated. The identification of genetic material in these ectoparasites could contribute important information about pathogens.

The aim of this study was to identify pathogens with zoonotic potential (*A. ovis*, *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Borellia* spp., *Coxiella* spp., *Francisiella tularensis*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia* spp., and *Theileria* spp.) in *L. fortisetosa* infesting cervids and in host-seeking louse flies in the environment.

2. Results

Overall, 9 of the 10 analyzed pathogens' DNA was identified, including 5 in group E and 9 in group A. In group A, *A. phagocytophilum* was identified in 20 (8%) samples, *Babesia* spp. —in 51 (20.4%) samples, *Bartonella* spp. —in 158 (63.2%) samples, *Borrelia* spp. —in 12 (4.8%) samples, *Coxiella* spp. —in 12 (4.8%) samples, *Francisella* spp. —in 7 (2.8%) samples, *Mycoplasma* spp. —in 74 (29.6%) samples, *Rickettsia* spp. —in 76 (30.4%) samples, and *Theileria* spp. —in 49 (19.6%) samples. In group E, *Bartonella* spp. was identified in 89 (35.6%) samples, *Coxiella* spp. —in 3 (1.2%) samples, *Francisella tularensis*, —in 2 (0.8%) samples, *Mycoplasma* spp. —in 17 (6.8%) samples, and *Rickettsia* spp. —in 30 (12%) samples. Detailed data are presented in Table 1. The representative sequences of selected

pathogens were deposited in the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information under the following accession numbers: *A. phagocytophilum* MW531454, MW531455; *Babesia* spp. MT350573, MW522567; *Bartonella* spp. MW531456, MW531457; *Borrelia* spp. MW531458, MW531459; *Coxiella* spp. MW526947, MW526948; *Francisella* spp. MW531460; *Mycoplasma* spp. MW547438, MW547439; *Rickettsia* spp. MW531461, MW531462; *Theileria* spp. MW531681, MW531682. The phylogenetic trees for the obtained sequences are presented in Figures 1–10.

Table 1. Prevalence of selected pathogens in *Lipoptena fortisetosa* with a division into voivodeships, groups, and sexes.

Species	Group A		Group E		Total n-500
	n-250		n-250		
	M n-99	F n-151	M n-115	F n-135	
Anaplasma ovis	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Anaplasma phagocytophilum	6 (6.0%)	14 (9.3%)	0 (0%)	0 (0%)	20 (4%)
Babesia spp.	21 (21.21%)	30 (19.86%)	0 (0%)	0 (0%)	51 (10.2%)
Bartonella spp.	64 (64.65%)	94 (62.25%)	37 (32.17)	52 (38.52%)	247 (49.4%)
Borrelia spp.	3 (3.03%)	9 (6.6%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (24.30%)
Coxiella spp.	3 (3.03%)	9 (6.6%)	1 (2.87%)	2 (1.48%)	15 (3%)
Francisella spp.	2 (2.02%)	5 (3.31%)	0 (0%)	2 (1.48%)	9 (1.8%)
Mycoplasma spp.	22 (22.22%)	52 (34.44%)	9 (7.82%)	8 (5.93%)	91 (18.2%)
Rickettsia spp.	30 (30.30%)	46 (30.46%)	14 (12.17%)	16 (3.2%)	106 (21.2%)
Theileria spp.	22 (22.22%)	27 (17.88%)	0 (0%)	0 (0%)	49 (9.8%)

Legend: A—Animals group; E—Environment group; M—male; F—female.

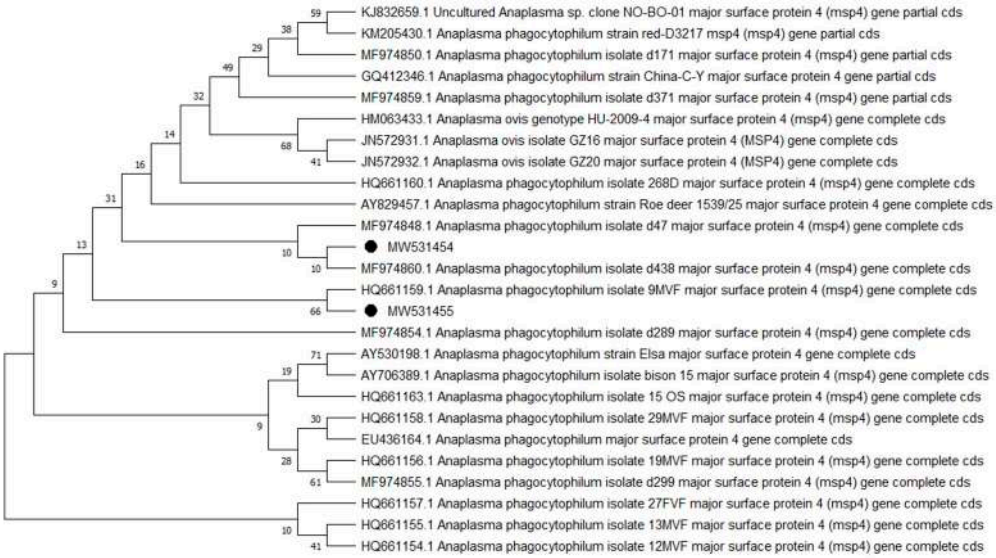


Figure 1. Phylogenetic topology for Neighbor Joining analysis of the MSP4 gene sequence of *Anaplasma phagocytophilum*. The unique haplotypes identified in this study are labeled with the corresponding sequence identification numbers and with dots. The reference sequences from GenBank are indicated in the tree. Bootstrap confidence values for branching reliability were calculated in 10,000 replicates.

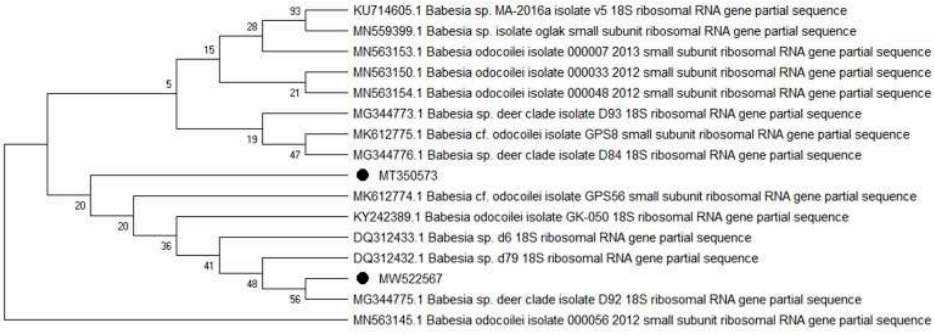


Figure 2. Phylogenetic topology for the Neighbor Joining analysis of the partial 18S rRNA gene sequence of *Babesia* spp. The unique haplotypes identified in this study are labeled with the corresponding sequence identification numbers and with dots. The reference sequences from GenBank are indicated in the tree. Bootstrap confidence values for branching reliability were calculated in 10,000 replicates.

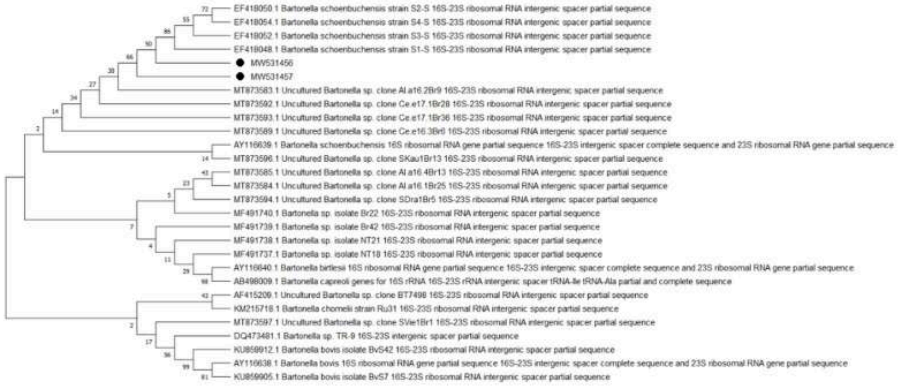


Figure 3. Phylogenetic topology for the Neighbor Joining analysis of the partial 16-23S gene sequence of *Bartonella* spp. The unique haplotypes identified in this study are labeled with the corresponding sequence identification numbers and with dots. The reference sequences from GenBank are indicated in the tree. Bootstrap confidence values for branching reliability were calculated in 10,000 replicates.

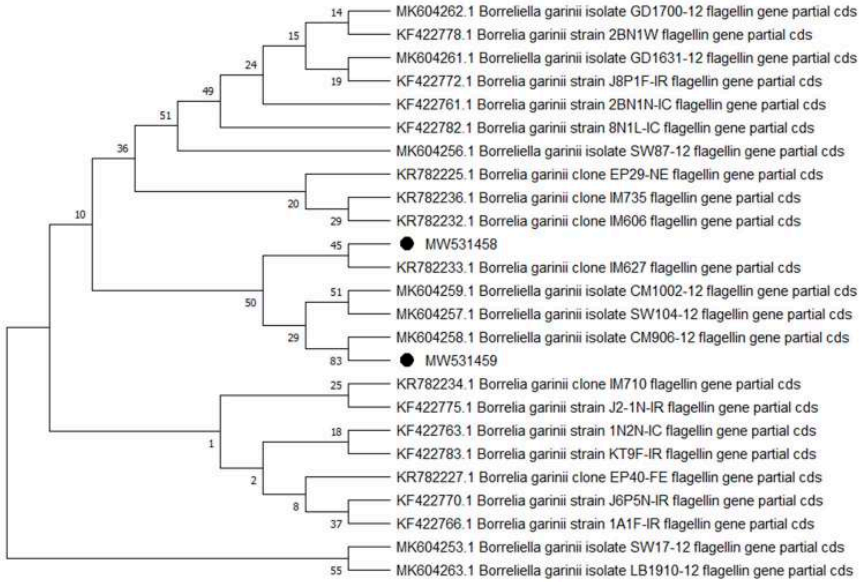


Figure 4. Phylogenetic topology for the Neighbor Joining analysis of the partial flagellin gene sequence of *Borrelia* spp. The unique haplotypes identified in this study are labeled with the corresponding sequence identification numbers and with dots. The reference sequences from GenBank are indicated in the tree. Bootstrap confidence values for branching reliability were calculated in 10,000 replicates.

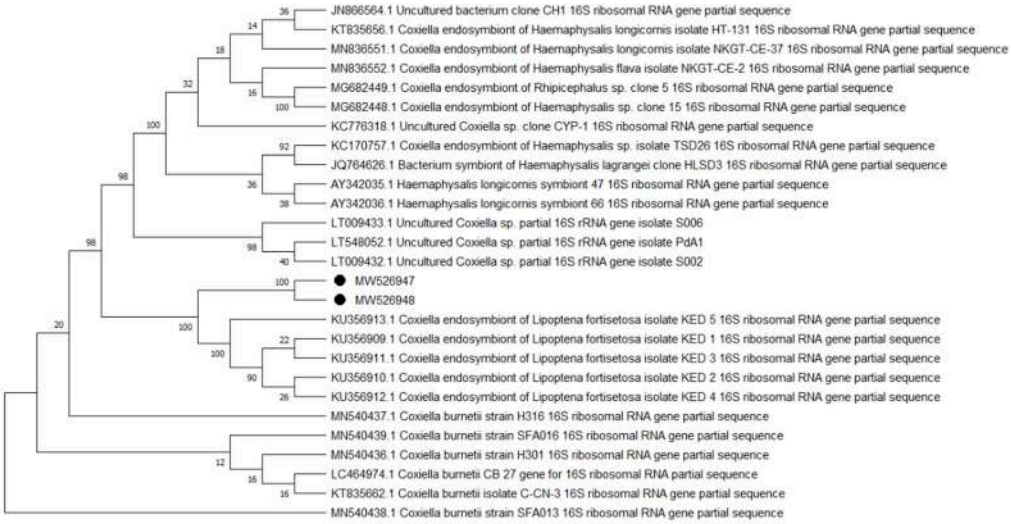


Figure 5. Phylogenetic topology for the Neighbor Joining analysis of the partial 16S rRNA gene sequence of *Coxiella* spp. The unique haplotypes identified in this study are labeled with the corresponding sequence identification numbers and with dots. The reference sequences from GenBank are indicated in the tree. Bootstrap confidence values for branching reliability were calculated in 10,000 replicates.

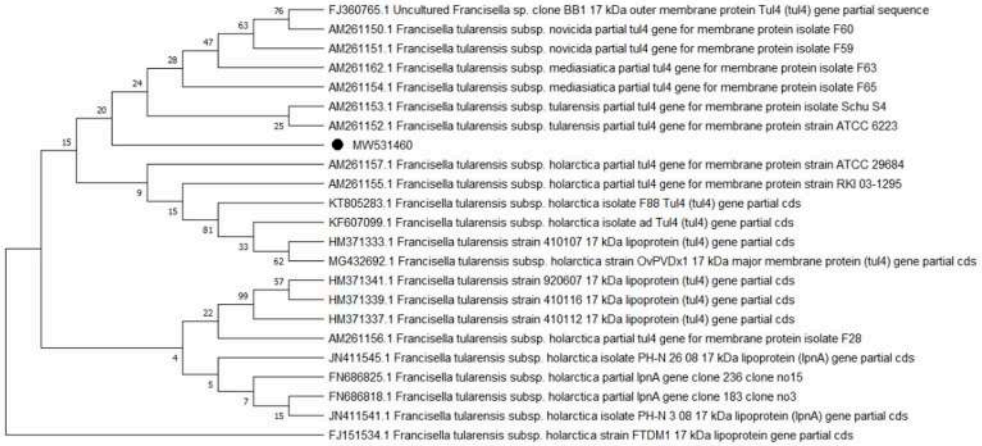


Figure 6. Phylogenetic topology for the Neighbor Joining analysis of the partial TUL4 gene sequence of *Francisella* spp. The unique haplotypes identified in this study are labeled with the corresponding sequence identification numbers and with dots. The reference sequences from GenBank are indicated in the tree. Bootstrap confidence values for branching reliability were calculated in 10,000 replicates.

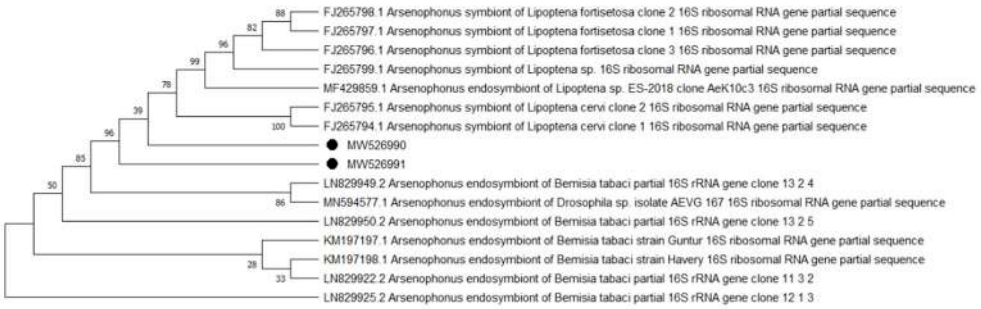


Figure 7. Phylogenetic topology for the Neighbor Joining analysis of the partial 16S rRNA gene sequence of *Arsenophonus* spp. The unique haplotypes identified in this study are labeled with the corresponding sequence identification numbers and with dots. The reference sequences from GenBank are indicated in the tree. Bootstrap confidence values for branching reliability were calculated in 10,000 replicates. The obtained sequences were acquired by cross-reaction.

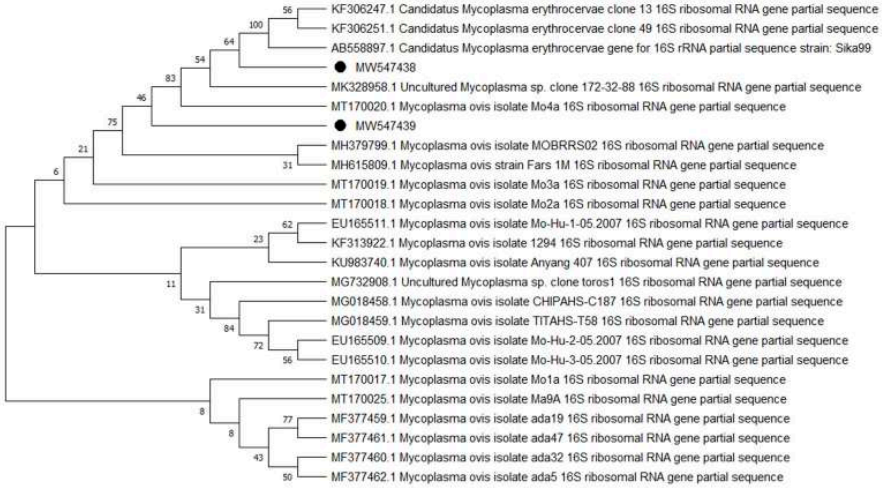


Figure 8. Phylogenetic topology for the Neighbor Joining analysis of the partial 16S rRNA gene sequence of *Mycoplasma* spp. The unique haplotypes identified in this study are labeled with the corresponding sequence identification numbers and with dots. The reference sequences from GenBank are indicated in the tree. Bootstrap confidence values for branching reliability were calculated in 10,000 replicates.

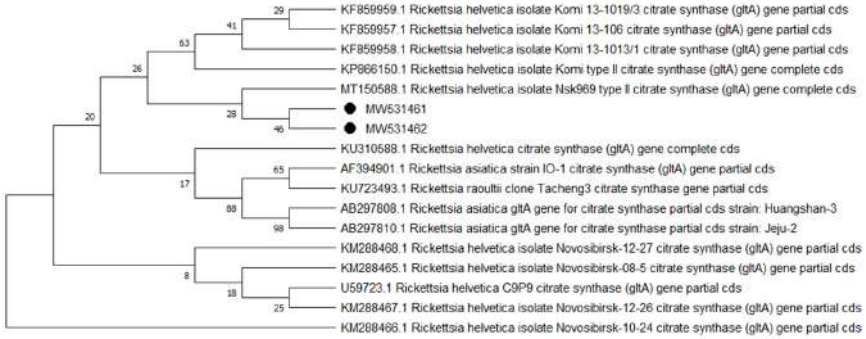


Figure 9. Phylogenetic topology for the Neighbor Joining analysis of the partial gltA gene sequence of *Rickettsia* spp. The unique haplotypes identified in this study are labeled with the corresponding sequence identification numbers and with dots. The reference sequences from GenBank are indicated in the tree. Bootstrap confidence values for branching reliability were calculated in 10,000 replicates.

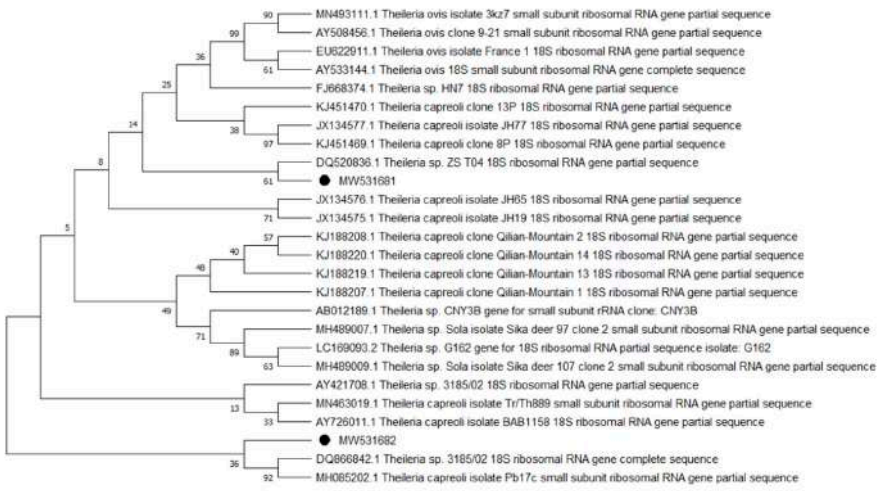


Figure 10. Phylogenetic topology for the Neighbor Joining analysis of the partial 18S rRNA gene sequence of *Theileria* spp. The unique haplotypes identified in this study are labeled with the corresponding sequence identification numbers and with dots. The reference sequences from GenBank are indicated in the tree. Bootstrap confidence values for branching reliability were calculated in 10,000 replicates.

Anaplasma phagocytophilum sequences (MW531454, MW531455) were characterized by 99.76% similarity with sequences from Hungary (MF974860) and Slovakia (HQ661159). One sequence (MT350573) was identical with *Babesia odocoilei* from Norway (MK612774). One sequence (MW522567) was identical with *Babesia* spp. from the Czech Republic (MG344773). *Bartonella schoenbuchensis* sequences (MW531456, MW531457) were identical with sequences from France (AY116639) and Poland (EF418048, EF418052). *Coxiella* spp. sequences (MW531458, MW531459) were characterized by 97.63–97.64% similarity with sequences from South Korea (KU356909-KU356913). One sequence (MW531460) was identical with the *Francisella tularensis subsp. holarctica* sequence from Germany (EF418048, EF418052). The remaining sequences of *Francisella* spp. have been identified as *Arsenophonus* spp. One sequence (MW547438) was identical with the Candidatus *Mycoplasma erythrocervae* sequence from Japan (KF306251, KF306247, AB558897). Another *Mycoplasma* spp. sequence (MW547439) was identical with *Mycoplasma ovis* sequences, from Hungary (EU165509) and Turkey (MF377462). Sequences of *Rickettsia* spp. (MW531461, MW531462) were identical with *Rickettsia helvetica* sequences from Russia (KU310588) and France (U59723). One sequence (MW531681) was characterized by 99.73% similarity with the *Theileria capreoli* sequence from Turkey (MN463019). A second *Theileria* spp. sequence (MW531682) was identical with sequences from Turkey (MN463019) and Spain in red deer imported from Germany (AY421708).

Deer keds sampled from animals were significantly more likely to harbor pathogens than the insects from environmental samples. Detection of pathogens' genetic material was significantly higher in female than male flies. DNA of *A. phagocyphilum* was more frequently identified in females than males. *Babesia* spp. genetic material was significantly more prevalent in *L. fortisetosa* sampled in the Warmia-Masuria and Lubusz voivodeships. The prevalence of *Bartonella* spp., *Coxiella* spp., *Mycoplasma* spp., and *Rickettsia* spp. DNA was significantly higher in group A than in group E. Genetic material of *Theileria* spp. was less frequently detected in insects sampled in the Lubusz voivodeship. Detailed data are presented in Table 2.

Table 2. Logistic regression model presenting statistically significant relationships between the analyzed pathogens vs. the sex, group, and sampling site of deer keds.

Parasite Species (Dependent Variables)	*p*-Value (for the Model)	Independent Variables		*SE*	*W*	*p*-Value *	*OR*
Total number	<0.001	sex	M	0.32	4.06	0.044	0.584
			F				1.476
		group	A	0.22	92.32	<0.001	8.04
			E				0.12
Anaplasma phagocytophilum		sex	M	0.56	2.85	0.03	1.24
			F				0.88
Babesia spp.		site	WM	0.54	4.33	0.037	3.09
			L	0.55	3.67	0.045	2.85
Bartonella spp.		group	A	0.20	26.04	<0.001	2.803
			E				0.36
Coxiella spp.		group	A	0.582	4.445	0.035	3.410
			E				0.293
Mycoplasma spp.		group	A	0.283	35.53	<0.001	5.40
			E				0.19
Rickettsia spp.		group	A	0.226	16.559	<0.001	2.51
			E				0.40
Theileria spp.		site	L	0.653	6.483	0.011	0.19

Legend: *—*p*-value < 0.05; SE—standard error; W—Wald coefficient; OR—odds ratio; M—male; F—female; A—animals group; E—environment group; WM—Warmia-Masuria; L—Lubusz.

Significant relationships between the prevalence of the examined pathogens were observed. The values of Cramer's V were indicative of the absence of associations or weak associations. The relationships between the prevalence of the analyzed pathogens are presented in detail in Table 3.

Table 3. Associations between the prevalence of the analyzed pathogens in *Lipoptena fortisetosa*, based on the calculated values of Cramer's V.

Species	*Anaplasma phagocytophilum*	*Babesia* spp.	*Bartonella* spp.	*Borrelia* spp.	*Coxiella* spp.	*Francisella tularensis*	*Mycoplasma* spp.	*Rickettsia* spp.	*Theileria* spp.
Anaplasma phagocytophilum	-	0.033 [b]	0.013 [b]	0.21 *,[a]	0.20 *,[a]	0.057 [b]	0.062 [b]	0.035 [b]	0.040 [b]
Babesia spp.	0.079 [a]	-	0.024 [b]	0.026 [b]	0.029 [b]	0.11 [b]	0.041 [b]	0.011 [b]	0.050 [b]
Bartonella spp.	0.026 [a]	0.094 *,[a]	-	0.005 [b]	0.016 [b]	0.037 [b]	0.029 [b]	0.009 [b]	0.04 [b]
Borrelia spp.	0.21 *,[a]	0.077 [a]	0.032 [a]	-	0.032 [b]	0.043 [b]	0.1 [b]	0.027 [b]	0.078 [b]
Coxiella spp.	0.16 *,[a]	0.010 [a]	0.037 [a]	0.043 [a]	-	0.045 [b]	0.073 [b]	0.080 [b]	0.025 [b]
Francisella spp.	0.035 [a]	0.12 *,[a]	0.024 [a]	0.025 [a]	0.30 [a]	-	0.063 [b]	0.059 [b]	0.041 [b]
Mycoplasma spp.	0.01 [a]	0.13 *,[a]	0.028 [a]	0.128 *,[a]	0.032 [a]	0.13 [a]	-	0.028 [b]	0.055 [b]
Rickettsia spp.	0.01 [a]	0.069 [a]	0.077 [a]	0.0080 [a]	0.11 *,[a]	0.039 [a]	0.050 [a]	-	0.046 [b]
Theileria spp.	0.08 *,[a]	0.16 *,[a]	0.11 [a]	0.12 *,[a]	0.012 [a]	0.008 [a]	0.052 [a]	0.090 [a]	-

Legend: *—χ^2 p-value < 0.05; [a]—Cramer's V for all samples; [b]—Cramer's V for animals group samples.

3. Discussion

The results of this study indicate that *L. fortisetosa* is ubiquitous in the analyzed voivodeships. In a previous study, this ectoparasite was identified only in isolated locations [5]. Deer keds could spread to new locations due to low level of host specificity as well as animal migrations. *Lipoptena fortisetosa* is an invasive species in Poland, but its population has been expanding steadily, which suggests that it has adapted well to the environmental conditions of Central Europe [14]. Louse flies infest hosts directly after pupation, and the emerged insects cover areas with a radius of 50 m [46]. Winged flies are responsible for the majority of non-specific host infestations, including in humans [23], companion animals [13], and livestock [19]. The host-seeking flights of *L. fortisetosa* may pose a threat for forest workers and hunters [23,47]. Hunters may become infested with *Lipoptena* spp. during the evisceration of wild animals. Hunting dogs may be attacked by these ectoparasites during tracking [13]. Cattle and horses grazing in the vicinity of forests also may be at risk of *L. fortisetosa* infestation [19,20]. People wearing dark clothing and animals with a dark fur coat are most susceptible to insect flights [48].

In this study, the prevalence and number of pathogens were lower in winged deer keds than in individuals sampled from cervids. Due to the fact that louse flies drop their wings upon attachment to the host, any subsequent switch in host is made more difficult [49]. However, *Lipoptena* spp. may switch hosts during the breeding season of cervids [50]. Infested mothers can also transmit these ectoparasites to their offspring [51]. In addition to insect bites, the infectious agent could also be transmitted when an insect is crushed on the skin [52]. Our results showed that *Lipoptena fortisetosa* carry DNA of pathogens, which might be collected through bloodmeal and transferred during the embryonic development of the larvae. The genetic material of *Babesia* spp., *Borrelia* spp., and *Theileria* spp. was detected only in deer keds that had direct contact with cervids. This is the first study to detect genetic material of *Babesia* spp. in deer keds. In addition, it is interesting to identify the DNA of *Borrelia* spp. in these ectoparasites in light of the fact that cervids are incompetent hosts for these bacteria [53]. The genetic material of *Bartonella* spp., *Mycoplasma*

spp., and *Rickettsia* spp. was identified additionally in winged insects sampled from the environment. The presence of the wings means that these individuals had no previous contact with the host [54]. Some pathogens may be carried by vectors without direct contact with a host. This is generally the result of acquiring a blood meal by a female. Due to the characteristic development of the new generation, host seekers may still carry remnants of a previous blood meal.

Interestingly, the analyzed insects also harbored *Coxiella* spp. and *Francisella tularensis*, and the prevalence of these bacteria in deer keds has been poorly investigated to date. These bacterial species were identified in both insect groups; however, most of the obtained sequences were identified as endosymbionts. In addition, the present findings do not provide sufficient evidence to substantiate the above claim because the isolation kit used in this study is intended to detect trace amounts of DNA. Pupae developing in the forest understory could have been contaminated with environmental bacteria. *Coxiella* spp. and *Francisella* spp. colonize soil [55,56], where pupation occurs. Additionally, it is interesting to find the Candidatus *Mycoplasma erythrocervae* bacterium, which was most closely related to isolates from Japan [57]. Either the variance of this genetic material associated with the DNA fragment under test is low, or the pathogen has been introduced with sika deer (*Cervus nippon*). It is possible that with the introduction of this species to Poland, the pathogen expanded in the population of native cervids. The possible presence of another pathogen of Japanese origin (*Bartonella* spp.) was also suggested in other studies [43].

Our description of pathogens 'genetic material detection with molecular tests might be an important consideration in research on deer keds' role in the transmission of infectious diseases. This research allows for a preliminary determination of potential pathogens for which *L. fortisetosa* may serve as vector. However, the transmission of the infectious agents by *L. fortisetosa* should be evaluated with the use of Koch's postulates [58–60]. For example, the development of *Babesia* spp. and *Theileria* spp. in *Lipoptena* spp. seems doubtful because ticks are the only known definitive hosts for these protozoa [61]. However, further research is needed to confirm this assumption. Despite the above, deer keds may act as mechanic vectors for these pathogens [4,37]. *Lipoptena cervi* has been suggested to mechanically transmit *A. phagocytophilum* to cervids [37,62]. Hornok et al. [63] identified *Theileria* spp. in stable flies (*Stomoxys calcitrans*) and suggested that this ectoparasite may pose a risk of mechanical transmission of theilerioses. Therefore, the research should assess whether a similar phenomenon may occur in deer keds. *Lipoptena fortisetosa* may be the potential biological vector for *Trypanosoma* spp. [35]. Currently, *Bartonella* spp. is the most comprehensively studied pathogen carried by *Lipoptena* spp., which appears to pose the greatest risk in infestation with these ectoparasites [40–43].

In the present study, genetic material of pathogens was more frequently identified in female than male *L. fortisetosa*, which could be explained by the fact that, in some ectoparasite species, females ingest more food than males [64,65]. Female insects of the genus *Lipoptena* spp. suck blood to draw nutrients that are needed for embryogenesis and intrauterine feeding of larvae [66]. Moreover, the exposure to microorganisms that are sucked with blood by females might last longer in the next generation. The logistic regression model revealed differences in pathogen prevalence between groups, which could suggest that some pathogen DNA may still be present in host-seeking ectoparasites. This study explored the idea that several of the detected microorganisms' DNA might have been vertically transmitted. Some pathogens were also more prevalent in selected voivodeships. These differences can probably be attributed to variations in pathogen prevalence across cervid populations [67,68]. The calculated values of Cramer's V point to the absence of significant associations between the prevalence of the studied pathogens, which could suggest that other vectors play a role in the transmission of these infectious agents.

In the future, deer keds could be used as biological markers of vector-borne diseases in cervid populations, due to the biology and behavior of these ectoparasites as well as specific ectoparasite-host relationships [46]. The acquisition of biological material—in particular, blood—that is suitable for molecular analyses could be problematic if the appropriate

transportation and analytical equipment and facilities are not available. Alternatively, *Lipoptena* spp. can be obtained from hosts that are more accessible during field studies. The present study demonstrated that DNA of the infectious agents might be identified in deer keds. In order to fully assess the potential of these ectoparasites as biological markers, it is necessary to compare the results of molecular analyses examining the blood samples with insects collected from the same animal.

Our studies showed that deer keds may harbor pathogenic microorganisms of significance; however, further investigation is needed to confirm whether intact and viable pathogens are indeed present, and if so, whether they can be transmitted by deer keds. Experiments performed on laboratory animals, which have not been performed to date, would elucidate the role of *Lipoptena* spp. in the eventual transmission of vector-borne diseases. Future research should focus on methods of controlling these ectoparasites and protecting humans and animals against their attacks. Greater attention should also be paid to *L. fortisetosa* in Central Europe, because its impact on indigenous cervid populations remains largely unknown.

4. Materials and Methods

4.1. Sample Collection

Deer keds were sampled in 2019 in five Polish voivodeships: Greater Poland, Kuyavia-Pomerania, Lubusz, Pomerania, and Warmia-Masuria. The location of these voivodeships on a map of Poland is presented in Figure 11. The collected specimens of *L. fortisetosa* were divided into two groups: Animals (A)—insects sampled from cervids, and Environment (E)—host-seeking insects sampled from the environment. A total of 500 *L. fortisetosa* individuals were sampled for the study. Group A was composed of 250 deer keds. Insects were collected from the bodies of dead or living cervids. One ectoparasite from each animal was randomly selected for analysis. Fifty individuals were acquired from each studied voivodeship. Group E consisted of 250 deer keds. Insects were collected in randomly selected Central European mixed forests. Up to 5 individuals of *L. fortisetosa* were acquired from each site. The investigator walked through the forest in the vicinity of wild animal habitats, wearing brown cotton clothing. Insects were captured after landing on the clothing and were immediately placed in test tubes. Fifty insects were obtained from each examined voivodeship. Group A and E ectoparasites were immersed in 70% ethanol in test tubes.

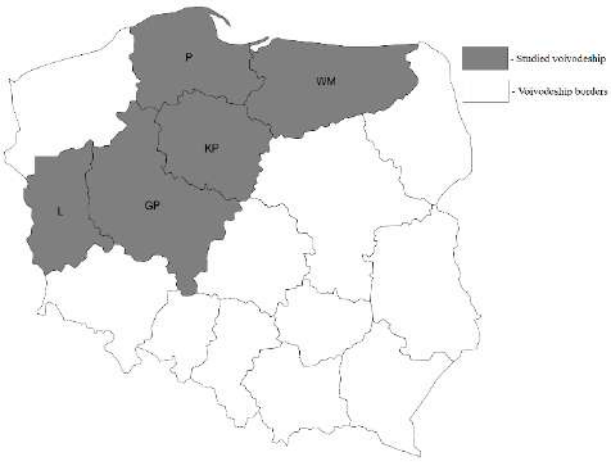


Figure 11. Map of Poland highlighting voivodships where *Lipoptena fortisetosa* samples were collected. Legend: GP—Greater Poland voivodeship; KP—Kuyavia-Pomerania voivodeship; L—Lubusz voivodeship; P—Pomerania voivodeship; WM—Warmia-Masuria voivodeship.

4.2. Species Identification

The sampled insects were analyzed in the Biological Hazard Laboratory at the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn. The species and sex of *L. fortisetosa* were identified based on the number of erect hairs on the mesonotum, the length and structure of palpi, wing venation, and body dimensions [3,44]. Images were acquired under the Leica M165C stereoscopic microscope (Leica, Wetzlar, Germany) with the use of Leica Application Suite 4.4 software (Leica, Wetzlar, Germany). Samples containing different insect species were excluded from further analysis.

4.3. DNA Extraction

Lipoptena fortisetosa were removed from test tubes, dried at room temperature for 15 min, and crushed individually with a sterile glass rod in sterile test tubes. Genomic DNA was extracted from each sample with the Sherlock AX universal kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) according to the manufacturer's instructions. DNA was eluted in 40 µl of TE buffer. The concentration of the final product was determined with the Nano Drop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The extracted DNA was stored at −20 °C until analysis.

4.4. Selection of Pathogens for Analysis

Based on a review of the literature [67–80], the following pathogens were selected and identified: *Anaplasma ovis*, *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Borellia* spp., *Coxiella burnetii*, *Francisiella tularensis*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia* spp., and *Theileria* spp.

4.5. Polymerase Chain Reaction

Primer sequences and PCR conditions are presented in Table 4. Every reaction was carried out in a final volume of 25 µL, containing 2.5 µL of 10× Standard Taq Reaction Buffer (Biolabs, Boston, MA, USA, USA), 0.5 µL of 10 mM dNTPs (Biolabs, USA), 0.5 µL of 10 µM solution of each primer, 1 µL of extracted DNA, 0.125 µL of Taq DNA polymerase (Biolabs, USA), and 19.875 µL of double-distilled water. The reaction was carried out in the Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). DNA was replaced with double-distilled water in the negative sample. The positive sample consisted of DNA samples of each analyzed pathogen and *L. fortisetosa* collected in a previous study. PCR products were electrophoresed on 1.5–2.5% agarose gel using a 100 bp DNA ladder as a molecular-weight size marker, stained with ethidium bromide, and viewed under a UV transilluminator. The two strongest expressed bands in each studied pathogen were sequenced. All PCR products that were DNA positive for *Francisella* spp. were validated using sequencing.

Table 4. Primers and PCR conditions.

Species	Target Gene	Name of Primer	Primer Sequence (5′–3′)	Expected Size (bp)	PCR Cycle Conditions	Reference
Anaplasma ovis	MSP4	MSP43R	CCG GAT CCT TAG CTG AAC AGG AAT CTT GC	347	94 °C/5 min; 40 cycles: 94 °C/30 s, 60 °C/30 s, 72 °C/1 min; 72 °C/7 min	Ochirkhuu et al. [81]
		MSP45F	GGG AGC TCC TAT GAA TTA CAG AGA ATT GTT TAC			
Anaplasma phagocytophilum	MSP4	Aphamsp4F	ATGAATTACAGAGAATTGCTTGTAGG	849	94 °C/5 min; 40 cycles: 94 °C/10 s, 58 °C/10 s, 72 °C/50 s; 72 °C/5 min	Bown et al. [82]
		Aphamsp4R	TTAATTGAAAGCAAATCTTGCTCCTATG			
Bovine * *Babesia* spp.	18S rRNA	BabsppF1	GTTTCTGMCCCATCAGCTTGAC	440	45 cycles: 94 °C/30 s, 61 °C/30 s, 72 °C/45 s; 72 °C/10 min	Hilpertshauser et al. [83]
		BabsppR	CAAGACAAAAGTCTGCTTGAAAC			
Bartonella spp.	16–23S gene	Bartonella spp. F	(C/T)CTTCGTTTCTCTTTCTTCA	154-260	95 °C/2min; 45 cycles: 95 °C/1 min, 60 °C/1 min, 72 °C/30 s; 72 °C/5 min	Jensen et al. [84]
		Bartonella spp. R	AACCAACTGAGCTACAAGCC			
Borrelia spp.	flagellin	Borrelia spp. flaF	ACATATTCAGATGCAGACAGAGGT	350	95 °C/5 min; 40 cycles: 95 °C/1 min, 55 °C/1 min, 72 °C/30 s; 72 °C/5 min	Barbour et al. [85]
		Borrelia spp. flaR	AACAGCTGAAGAGCTTGGAATG			
Coxiella burnetii	16S rRNA	Coxiella 16SrRNA F	ATTGAAGAGTTTGATTCTGG	1457	95 °C/3 m; (2 cycles: 95 °C/30 s, 58 °C/30 s, 72 °C/2 min; 10 cycles: 95 °C/30 s, 58–50 °C/30 s (–2 every 2 cycles), 72 °C/2 min; 30 cycles: 95 °C/30 s, 48 °C/30 s, 72 °C/2 min); 72 °C/5 min	Zheng et al. [86]
		Coxiella 16SrRNA R	CGGCTTCCCGAAGGTTAG			
Francisella tularensis	TUL4	Ff393	ATGGCGAGTGATACTGCTTG	248	98 °C/30 s; 35 cycles: 98 °C/10 s, 53.4 °C/ 30 s, 72 °C/1 min; 72 °C/10 min	Long et al. [87]
		Ff642	GCATCATCAGAGCCACCTAA			
Mycoplasma spp.	16S rRNA	HBT-F	ATA CGG CCC ATA TTC CTA CG	595	94 °C/10 min; 40 cycles: 95 °C/30 s, 60 °C/30 s, 72 °C/30 s; 72 °C/10 min	Liu et al. [88]
		HBT-R	TGC TCC ACC ACT TGT TCA			
Rickettsia spp.	gltA	Rickettsia gltA F	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	401	95 °C/3 min; 40 cycles: 95 °C/15 s, 48 °C/30 s, 72 °C/30 s; 72 °C/7 min	Labruna et al. [89]
		Rickettsia gltA R	GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT			
Theileria spp.	18S rRNA	989	AGT TTC TGA CCT ATC AG	1098	94 °C/5 min; 35 cycles: 94 °C/30 s, 53 °C/30 s, 72 °C/1 min; 72 °C/7 min	Li et al. [90]
		990	TTG CCT TAA ACT TCC TTG			

Legend: *—B. divergens, B. bigemina, B. major.

4.6. Sequencing

DNA samples were purified by ethanol precipitation. Cycle-sequencing reactions were carried out with the use of the described primers, BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The obtained nucleotide sequences were edited in the BioEdit program [91] and compared with GenBank data in the BLAST-NCBI program. A phylogenetic analysis of the obtained sequences and the corresponding GenBank sequences was conducted by the Neighbor Joining estimation in MEGA 10.1.17 [92]. Bootstrap confidence values for estimating branching reliability were calculated in 10,000 replicates.

4.7. Statistical Analysis

The significance of possible relationships between the presence of pathogens and sample characteristics was determined in a logistic regression model, where the dependent variable was the dichotomous variable (absence (0)/presence (1) of the analyzed pathogen), whereas the insects' sex (male/female), group (A or E), and site (examined voivodeships) were the independent variables. The associations between the prevalence of the analyzed pathogens were examined by calculating Cramer's V, where values close to 0 denoted weak associations and values approximating $+1/-1$ denoted stronger associations. Data were processed statistically in the Statistica 13.3 program (TIBCO Software Inc., Palo Alto, Santa Clara, CA, USA).

5. Conclusions

The analyzed deer ked samples, obtained from animals and the environment, harbored the genetic material of *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Borellia* spp., *Coxiella*-like endosymbionts, *Francisiella tularensis*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia* spp., and *Theileria* spp. Deer keds may be used as biological markers for identifying pathogens in cervid populations, but further research is needed to confirm this assumption. Future research might reveal the competency of the *L. fortisetosa* as a biological or mechanical vector. The role of *L. fortisetosa* as a vector of pathogens requires further, more extensive investigations due to their new colonization sites and attacks on humans and animals. These are important considerations that require further attention.

Author Contributions: Conceptualization, R.G.; methodology, R.G.; software, R.G.; validation, R.G.; formal analysis, R.G. and E.M.G.; investigation, R.G.; resources, R.G.; data curation, R.G.; writing—original draft preparation, R.G.; writing—review and editing, R.G.; visualization, R.G.; supervision, J.J., X.X. and T.B.; project administration, R.G.; funding acquisition, R.G., J.J., X.X and T.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The project was financially supported by the Minister of Science and Higher Education under the program entitled "Regional initiative of Excellence" for the years 2019–2022, Project No. 010/RID/2018/19, amount of funding PLN 12,000,000. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to thank the "Healthy Animal—Safe Food" Scientific Consortium of the Leading National Research Center (KNOW) (grant No. 05-1/KNOW2/2015) for supporting cooperation between the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn and the National Research Center for Protozoan Diseases of the Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine. The authors are also grateful to hunters and forestry employees for their assistance in collecting research samples.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bueno-Marí, R.; Jiménez-Peydró, R. *Anopheles plumbeus* Stephens, 1828: A neglected malaria vector in Europe. *Malar. Rep.* **2011**, *1*, e2. [CrossRef]
2. Baldacchino, F.; Desquesnes, M.; Mihok, S.; Foil, L.D.; Duvallet, G.; Jittapalapong, S. Tabanids: Neglected subjects of research, but important vectors of disease agents! *Infect. Genet. Evol.* **2014**, *28*, 596–615. [CrossRef]
3. Salvetti, M.; Bianchi, A.; Marangi, M.; Barlaam, A.; Giacomelli, S.; Bertoletti, I.; Roy, L.; Giangaspero, A. Deer keds on wild ungulates in northern Italy, with a taxonomic key for the identification of *Lipoptena* spp. of Europe. *Med. Vet. Entomol.* **2019**, *34*, 74–85. [CrossRef] [PubMed]
4. Bezerra-Santos, M.A.; Otranto, D. Keds, the enigmatic flies and their role as vectors of pathogens. *Acta Trop.* **2020**, *209*, 105521. [CrossRef] [PubMed]
5. Kowal, J.; Nosal, P.; Kornaś, S.; Wajdzik, M.; Matysek, M.; Basiaga, M. Biodiversity and importance of hippoboscids infection in cervids. *Med. Weter.* **2016**, *72*, 745–749.
6. Maa, T.C. A synopsis of the Lipopteninae. *J. Med. Entomol.* **1965**, *2*, 233–248. [CrossRef] [PubMed]
7. Borowiec, L.; Zatwarnicki, T. *Lipoptena fortisetosa* Maa, 1965 (Diptera, Hippoboscidae), nowy gatunek dla fauny Polski. *Prz. Zool.* **1989**, *33*, 579–582.
8. Kowal, J.; Nosal, P.; Rościszewska, M.; Matysek, M. New records of *Lipoptena fortisetosa* Maa, 1965 (Diptera:Hippoboscidae) in Poland. *Dipteron* **2009**, *25*, 27–29.
9. Cydzik, K.; Kadulski, S. *Parasitic Insects of the Red Deer (Cervus elaphus L.) in Northeastern Poland. Stawonogi. Inwazje i Ich Ograniczanie*; Akapit: Lublin, Poland, 2009; pp. 113–115.
10. Jędrysik, D.; Kadulski, S. *Parasitic Arthropods of Roe Deer Capreolus capreolus (L.) of the Region of Pojezierze Południowobałtyckie (The Southern Baltic Lake District). Arthropods. The Medical and Economic Importance*; Akapit: Lublin, Poland, 2012; pp. 95–103.
11. Matysek, M.; Kowal, J. Dwa nowe gatunki muchówek. *Tatry* **2014**, *48*, 64–65.
12. Kadulski, S. Lipoptena Nitzsch, 1818 in Poland. *Wiadomości Parazytologiczne* **1998**, *44*, 462.
13. Sokół, R.; Gałęcki, R. Prevalence of keds on city dogs in central Poland. *Med. Vet. Entomol.* **2017**, *31*, 114–116. [CrossRef] [PubMed]
14. Gałęcki, R.; Jaroszewski, J.; Xuan, X.; Bakuła, T. Temporal-Microclimatic Factors Affect the Phenology of *Lipoptena fortisetosa* in Central European Forests. *Animals* **2020**, *10*, 2012. [CrossRef] [PubMed]
15. Hermosilla, C.; Pantchev, N.; Bachmann, R.; Bauer, C. *Lipoptena cervi* (deer ked) in two naturally infested dogs. *Vet. Rec.* **2006**, *159*, 286. [CrossRef] [PubMed]
16. Kadulski, S. Ectoparasites of Cervidae in north-east Poland. *Acta Parasitol.* **1996**, *41*, 204–210.
17. Szczurek, B.; Kadulski, S. Ectoparasites on fallow deer, *Dama dama* (L.) in Pomerania, Poland. *Acta Parasitol.* **2004**, *49*, 80–86.
18. Izdebska, J.N. European bison arthropod parasites from closed Polish breeding facilities. *Acta Parasitol.* **2001**, *46*, 135–137.
19. Metelitsa, A.K.; Veselkin, G.A. Parasitism of the louse fly *Lipoptena fortisetosa* on cattle. *Parazitologiia* **1989**, *23*, 276–277.
20. Dehio, C.; Sauder, U.; Hiestand, R. Isolation of *Bartonella schoenbuchensis* from *Lipoptena cervi*, a blood-sucking arthropod causing deer ked dermatitis. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 5320–5323. [CrossRef]
21. Ivanov, V.I. Anthropophilia of the deer blood sucker *Lipoptena cervi* L. (Diptera, Hippoboscidae). *Med. Parazitol.* **1975**, *44*, 491–495.
22. Buczek, W.; Buczek, A.M.; Bartosik, K.; Buczek, A. Comparison of skin lesions caused by Ixodes ricinus ticks and Lipoptena cervi deer keds infesting humans in the natural environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 3316. [CrossRef]
23. Maślanko, W.; Bartosik, K.; Raszewska-Famielec, M.; Szwaj, E.; Asman, M. Exposure of Humans to Attacks by Deer Keds and Consequences of Their Bites—A Case Report with Environmental Background. *Insects* **2020**, *11*, 859. [CrossRef]
24. Vikøren, T.; Lillehaug, A.; Handeland, K. *Helseovervakingsprogrammet for Hjortevilt (HOP), Årsrapport for 2006 og 2007*; National Veterinary Inst. Report Series; National Veterinary Institute: Oslo, Norway, 2008.
25. Madslien, K.; Ytrehus, B.; Vikøren, T.; Malmsten, J.; Isaksen, K.; Hygen, H.O.; Solberg, E.J. Hair-loss epizootic in moose (*Alces alces*) associated with massive deer ked (*Lipoptena cervi*) infestation. *J. Wildl. Dis.* **2011**, *47*, 893–906. [CrossRef]
26. Rantanen, T.; Reunala, T.; Vuojolahti, P.; Hackman, W. Persistent pruritic papules from deer ked bites. *Acta Derm. Venereol.* **1982**, *62*, 307–311.
27. Laukkanen, A.; Ruoppi, P.; Mäkinen-Kiljunen, S. Deer ked-induced occupational allergic rhinoconjunctivitis. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **2005**, *94*, 604–608. [CrossRef]
28. Decastello, A.; Farkas, R. Anaphylactic reaction following forest fly (*Hippobosca equina*) bite: A human case. *Clin. Exp. Med J.* **2010**, *4*, 193–198. [CrossRef]
29. Benelli, G.; Duggan, M.F. Management of arthropod vector data–Social and ecological dynamics facing the One Health perspective. *Acta Trop.* **2018**, *182*, 80–91. [CrossRef]
30. Mencke, N. Future challenges for parasitology: Vector control and 'One health'in Europe: The veterinary medicinal view on CVBDs such as tick borreliosis, rickettsiosis and canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* **2013**, *195*, 256–271. [CrossRef]
31. Baker, J.R. A review of the role played by the Hippoboscidae (Diptera) as vectors of endoparasites. *J. Parasitol.* **1967**, *53*, 412–418. [CrossRef]
32. Regier, Y.; Komma, K.; Weigel, M.; Pulliainen, A.T.; Göttig, S.; Hain, T.; Kempf, V.A. Microbiome analysis reveals the presence of Bartonella spp. and Acinetobacter spp. in deer keds (*Lipoptena cervi*). *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 3100. [CrossRef]
33. Lee, S.H.; Kim, K.T.; Kwon, O.D.; Ock, Y.; Kim, T.; Choi, D.; Kwak, D. Novel detection of *Coxiella* spp.; *Theileria luwenshuni*, and *T. ovis* endosymbionts in deer keds (*Lipoptena fortisetosa*). *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0156727.

34. Böse, R.; Petersen, K. *Lipoptena cervi* (Diptera), a potential vector of Megatrypanum trypanosomes of deer (Cervidae). *Parasitol. Res.* **1991**, *77*, 723–725. [CrossRef]
35. Werszko, J.; Steiner-Bogdaszewska, Ż.; Jeżewski, W.; Szewczyk, T.; Kuryło, G.; Wołkowycki, M.; Wróblewski, P.; Karbowiak, G. Molecular detection of *Trypanosoma* spp. in *Lipoptena cervi* and *Lipoptena fortisetosa* (Diptera: Hippoboscidae) and their potential role in the transmission of pathogens. *Parasitology* **2020**, *147*, 1–7. [CrossRef]
36. Hornok, S.; de la Fuente, J.; Biró, N.; Fernández de Mera, I.G.; Meli, M.L.; Elek, V.; Gönczi, E.; Meili, T.; Tánczos, B.; Farkas, R.; et al. First molecular evidence of *Anaplasma ovis* and *Rickettsia* spp. in keds (Diptera: Hippoboscidae) of sheep and wild ruminants. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2011**, *11*, 1319–1321. [CrossRef]
37. Víchová, B.; Majláthová, V.; Nováková, M.; Majláth, I.; Čurlík, J.; Bona, M.; Komjáti-Nagyová, M.; Pet'ko, B. PCR detection of re-emerging tick-borne pathogen, *Anaplasma phagocytophilum*, in deer ked (*Lipoptena cervi*) a blood-sucking ectoparasite of cervids. *Biologia* **2011**, *66*, 1082. [CrossRef]
38. Doby, J.M.; Bigaignon, G.; Degeilh, B.; Guiguen, C. Ectoparasites of large wild mammals (deer and wild boars) and Lyme borreliosis. Search for *Borrelia burgdorferi* in more than 1400 ticks, lice, Pupipara Diptera and fleas. *Rev. Med. Vet-Toulouse* **1994**, *145*, 743–748.
39. Hulinsky, V.; Smetana, K. Molecular and microscopical evidence of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in patients, animals and ticks in the Czech Republic. *New Microbiol.* **2002**, *25*, 437–448.
40. De Bruin, A.; Van Leeuwen, A.D.; Jahfari, S.; Takken, W.; Földvári, M.; Dremmel, L.; Sprong, H.; Földvári, G. Vertical transmission of *Bartonella schoenbuchensis* in *Lipoptena cervi*. *Parasites Vectors* **2015**, *8*, 176. [CrossRef]
41. Korhonen, E.M.; Vera, C.P.; Pulliainen, A.T.; Sironen, T.; Aaltonen, K.; Kortet, R.; Härkönen, L.; Härkönen, S.; Paakkonen, T.; Nieminen, P.; et al. Molecular detection of *Bartonella* spp. in deer ked pupae, adult keds and moose blood in Finland. *Epidemiol. Infect.* **2015**, *143*, 578–585. [CrossRef]
42. Songailaitė, L.; Klepeckienė, K.; Paulauskas, A.; Radzijevskaja, J. Molecular detection of *Bartonella* spp. in deer keds Lipoptena cervi and Lipoptena fortisetosa in Lithuania. In Proceedings of the Smart Bio: ICSB 2nd International Conference, Kaunas, Lithuania, 3–5 May 2018; Abstracts book. Vytautas Magnus University: Kaunas, Lithuania, 2018.
43. Szewczyk, T.; Werszko, J.; Steiner-Bogdaszewska, Ż.; Jeżewski, W.; Laskowski, Z.; Karbowiak, G. Molecular detection of *Bartonella* spp. in deer ked (*Lipoptena cervi*) in Poland. *Parasites Vectors* **2017**, *10*, 487. [CrossRef]
44. Andreani, A.; Sacchetti, P.; Belcari, A. Comparative morphology of the deer ked *Lipoptena fortisetosa* first recorded from Italy. *Med. Vet. Entomol.* **2019**, *33*, 140–153. [CrossRef]
45. Kurina, O.; Kirik, H.; Õunap, H.; Õunap, E. The northernmost record of a blood-sucking ectoparasite, *Lipoptena fortisetosa* Maa (Diptera: Hippoboscidae), in Estonia. *Biodivers. Data J.* **2019**, *7*, e47857. [CrossRef]
46. Paakkonen, T. Ecophysiology of the Deer Ked (*Lipoptena cervi*) and Its Hosts. Ph.D. Thesis, University of Eastern Finland, Joensuu, Finland, 2012. Available online: https://core.ac.uk/download/pdf/15169155.pdf (accessed on 23 April 2020).
47. Härkönen, S.; Laine, M.; Vornanen, M.; Reunala, T. Deer ked (*Lipoptena cervi*) dermatitis in humans–an increasing nuisance in Finland. *Alces* **2009**, *45*, 73–79.
48. Kortet, R.; Härkönen, L.; Hokkanen, P.; Härkönen, S.; Kaitala, A.; Kaunisto, S.; Laaksonen, S.; Kekäläinen, J.; Ylönen, H. Experiments on the ectoparasitic deer ked that often attacks humans; preferences for body parts, colour and temperature. *Bull. Entomol. Res.* **2010**, *100*, 279. [CrossRef]
49. Halkman, W. Immigration of *Lipoptera cervi* (Diptera, Hippoboscidae) in Finland, with notes on its biology and medical significance. *Not. Entomol.* **1983**, *63*, 53–59.
50. Davis, J.W. Deer ked infestation on white-tailed deer in East Texas. *J Wildl. Manag.* **1973**, *37*, 183–186. [CrossRef]
51. Samuel, W.; Trainer, D. *Lipoptena mazamae* Rondani, 1878 (Diptera: Hippoboscidae) on white-tailed deer in southern Texas. *J. Med. Entomol.* **1972**, *9*, 104–106. [CrossRef] [PubMed]
52. Frischknecht, F. The skin as interface in the transmission of arthropod-borne pathogens. *Cell. Microbiol.* **2007**, *9*, 1630–1640. [CrossRef] [PubMed]
53. Jaenson, T.G.; Tälleklint, L. Incompetence of roe deer as reservoirs of the Lyme borreliosis spirochete. *J. Med. Entomol.* **1992**, *29*, 813–817. [CrossRef] [PubMed]
54. Haarløv, N. Life cycle and distribution pattern of *Lipoptena cervi* (L.) (Dipt.; Hippobosc.) on Danish deer. *Oikos* **1964**, *15*, 93–129. [CrossRef]
55. Barns, S.M.; Grow, C.C.; Okinaka, R.T.; Keim, P.; Kuske, C.R. Detection of diverse new *Francisella*-like bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 5494–5500. [CrossRef]
56. Shabbir, M.Z.; Akram, S.; ul Hassan, Z.; Hanif, K.; Rabbani, M.; Muhammad, J.; Chaudhary, M.H.; Abbas, T.; Ghori, M.T.; Rashid, H.; et al. Evidence of *Coxiella burnetii* in Punjab province, Pakistan. *Acta Trop.* **2016**, *163*, 61–69. [CrossRef]
57. Watanabe, Y.; Fujihara, M.; Obara, H.; Matsubara, K.; Yamauchi, K.; Harasawa, R. Novel hemoplasma species detected in free-ranging sika deer (*Cervus nippon*). *J. Vet. Med. Sci.* **2010**, *72*, 1527–1530. [CrossRef] [PubMed]
58. Evans, A.S. Causation and disease: The Henle-Koch postulates revisited. *Yale J. Biol. Med.* **1976**, *49*, 175.
59. Gradmann, C. A spirit of scientific rigour: Koch's postulates in twentieth-century medicine. *Microbes Infect.* **2014**, *16*, 885–892. [CrossRef] [PubMed]
60. Byrd, A.L.; Segre, J.A. Adapting Koch's postulates. *Science* **2016**, *351*, 224–226. [CrossRef] [PubMed]
61. Gray, J.S.; Estrada-Peña, A.; Zintl, A. Vectors of babesiosis. *Annu. Rev. Entomol.* **2019**, *64*, 149–165. [CrossRef] [PubMed]

62. Buss, M.; Case, L.; Kearney, B.; Coleman, C.; Henning, J.D. Detection of Lyme disease and anaplasmosis pathogens via PCR in Pennsylvania deer ked. *J. Vector Ecol.* **2016**, *41*, 292–294. [CrossRef]
63. Hornok, S.; Takács, N.; Szekeres, S.; Szőke, K.; Kontschán, J.; Horváth, G.; Sugár, L. DNA of *Theileria orientalis*, *T. equi* and *T. capreoli* in stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *Parasites Vectors* **2020**, *13*, 1–6. [CrossRef]
64. Yanovski, A.D.; Ogston, C.W. Sex differences in size of the blood meal in the bed bug *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *J. Med. Entomol.* **1982**, *19*, 45–47. [CrossRef]
65. Lehane, M. *The Biology of Blood-Sucking in Insects*; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2005; pp. 202–258.
66. Mustonen, A.M.; Käkelä, R.; Paakkonen, T.; Nieminen, P. Life stage-related differences in fatty acid composition of an obligate ectoparasite, the deer ked (*Lipoptena cervi*)—Influence of blood meals and gender. *CBP Part A Mol. Integr. Physiol.* **2015**, *179*, 62–70. [CrossRef]
67. Kauffmann, M.; Rehbein, S.; Hamel, D.; Lutz, W.; Heddergott, M.; Pfister, K.; Silaghi, C. *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. in roe deer (*Capreolus capreolus*), fallow deer (*Dama dama*) and mouflon (*Ovis musimon*) in Germany. *Mol. Cell. Probes* **2017**, *31*, 46–54. [CrossRef] [PubMed]
68. Sawczuk, M.; Maciejewska, A.; Skotarczak, B. Identification and molecular characterization of *Theileria* sp. infecting red deer (*Cervus elaphus*) in northwestern Poland. *Eur. J. Wildl. Res.* **2008**, *54*, 225–230. [CrossRef]
69. Bruno, P.; Bruno, G.; Claudine, P.E. Detection of spirochaetes of *Borrelia burgdorferi* complexe in the skin of cervids by PCR and culture. *Eur. J. Epidemiol.* **2000**, *16*, 869–873. [CrossRef]
70. Sacristán, C.; das Neves, C.G.; Suhel, F.; Sacristán, I.; Tengs, T.; Hamnes, I.S.; Madslien, K. *Bartonella* spp. detection in ticks, Culicoides biting midges and wild cervids from Norway. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
71. Dehio, C.; Lanz, C.; Pohl, R.; Behrens, P.; Bermond, D.; Piémont, Y.; Pelz, K.; Sander, A. *Bartonella schoenbuchii* sp. nov.; isolated from the blood of wild roe deer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2001**, *51*, 1557–1565. [CrossRef] [PubMed]
72. Astobiza, I.; Barral, M.; Ruiz-Fons, F.; Barandika, J.F.; Gerrikagoitia, X.; Hurtado, A.; García-Pérez, A.L. Molecular investigation of the occurrence of *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. *Vet. Microbiol.* **2011**, *147*, 190–194. [CrossRef] [PubMed]
73. Oaaland, T.; Christiansen, E.; Jonsson, B.; Kapperud, G.; Wiger, R. A survey of tularemia in wild mammals from Fennoscandia. *J. Wildl. Dis.* **1977**, *13*, 393–399. [CrossRef]
74. Bourque, M.; Higgins, R. Serologic studies on brucellosis, leptospirosis and tularemia in moose (*Alces alces*) in Quebec. *J. Wildl. Dis.* **1984**, *20*, 95–99. [CrossRef] [PubMed]
75. Aguirre, A.A.; Hansen, D.E.; Starkey, E.E.; McLean, R.G. Serologic survey of wild cervids for potential disease agents in selected national parks in the United States. *Prev. Vet. Med.* **1995**, *21*, 313–322. [CrossRef]
76. Grazziotin, A.L.; Santos, A.P.; Guimaraes, A.M.S.; Mohamed, A.; Cubas, Z.S.; de Oliveira, M.J.; dos Santos, L.C.; de Moraes, W.; da Costa Vieira, R.F.; Donatti, L.; et al. *Mycoplasma ovis* in captive cervids: Prevalence, molecular characterization and phylogeny. *Vet. Microbiol.* **2011**, *152*, 415–419. [CrossRef] [PubMed]
77. Grazziotin, A.L.; Duarte, J.M.B.; Szabó, M.P.J.; Santos, A.P.; Guimarães, A.M.S.; Mohamed, A.; da Costa Vieira, R.F.; de Barros Filho, I.R.; Biondo, A.W.; Messick, J.B. Prevalence and molecular characterization of *Mycoplasma ovis* in selected free-ranging Brazilian deer populations. *J. Wildl. Dis.* **2011**, *47*, 1005–1011. [CrossRef]
78. Stefanidesova, K.; Kocianova, E.; Boldis, V.; Kostanova, Z.; Kanka, P.; Nemethova, D.; Spitalska, E. Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* infection in free-ranging ungulates in central Slovakia. *Eur. J. Wildl. Res.* **2008**, *54*, 519–524. [CrossRef]
79. Inokuma, H.; Seino, N.; Suzuki, M.; Kaji, K.; Takahashi, H.; Igota, H.; Inoue, S. Detection of *Rickettsia helvetica* DNA from peripheral blood of sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Japan. *J. Wildl. Dis.* **2008**, *44*, 164–167. [CrossRef]
80. Elfving, K.; Malmsten, J.; Dalin, A.M.; Nilsson, K. Serologic and molecular prevalence of *Rickettsia helvetica* and *Anaplasma phagocytophilum* in wild cervids and domestic mammals in the central parts of Sweden. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2015**, *15*, 529–534. [CrossRef]
81. Ochirkhuu, N.; Konnai, S.; Odbileg, R.; Murata, S.; Ohashi, K. Molecular epidemiological survey and genetic characterization of *Anaplasma* species in Mongolian livestock. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2017**, *17*, 539–549. [CrossRef] [PubMed]
82. Bown, K.J.; Lambin, X.; Ogden, N.H.; Petrovec, M.; Shaw, S.E.; Woldehiwet, Z.; Birtles, R.J. High-resolution genetic fingerprinting of European strains of *Anaplasma phagocytophilum* by use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 1771–1776. [CrossRef]
83. Hilpertshauser, H.; Deplazes, P.; Schnyder, M.; Gern, L.; Mathis, A. *Babesia* spp. identified by PCR in ticks collected from domestic and wild ruminants in southern Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 6503–6507. [CrossRef] [PubMed]
84. Jensen, W.A.; Fall, M.Z.; Rooney, J.; Kordick, D.L.; Breitschwerdt, E.B. Rapid Identification and Differentiation of *Bartonella* Species Using a Single-Step PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, *38*, 1717–1722. [CrossRef]
85. Barbour, A.G.; Maupin, G.O.; Teltow, G.J.; Carter, C.J.; Piesman, J. Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: Possible agent of a Lyme disease-like illness. *J. Infect. Dis.* **1996**, *173*, 403–409. [CrossRef]
86. Zheng, W.; Liu, M.; Moumouni, P.F.A.; Liu, X.; Efstratiou, A.; Liu, Z.; Liu, Y.; Tao, H.; Guo, H.; Wang, G.; et al. First molecular detection of tick-borne pathogens in dogs from Jiangxi, China. *J. Vet. Sci.* **2017**, *79*, 248–254. [CrossRef]
87. Long, G.W.; Oprandy, J.J.; Narayanan, R.B.; Fortier, A.H.; Porter, K.R.; Nacy, C.A. Detection of *Francisella tularensis* in blood by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **1993**, *31*, 152–154. [CrossRef] [PubMed]

88. Liu, M.; Ruttayaporn, N.; Saechan, V.; Jirapattharasate, C.; Vudriko, P.; Moumouni, P.F.A.; Cao, S.; Inpankaew, T.; Ybañez, A.P.; Suzuki, H.; et al. Molecular survey of canine vector-borne diseases in stray dogs in Thailand. *Parasitol. Int.* **2016**, *65*, 357–361. [CrossRef]
89. Labruna, M.B.; Whitworth, T.; Horta, M.C.; Bouyer, D.H.; McBride, J.W.; Pinter, A.; Popov, V.; Gennari, S.M.; Walker, D.H. Rickettsia species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 90–98. [CrossRef] [PubMed]
90. Li, Y.; Chen, Z.; Liu, Z.; Liu, J.; Yang, J.; Li, Q.; Li, Y.; Cen, S.; Guan, G.; Ren, Q.; et al. Molecular identification of *Theileria* parasites of northwestern Chinese Cervidae. *Parasites Vectors* **2014**, *7*, 1–7. [CrossRef]
91. Hall, T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1999**, *41*, 95–98.
92. Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Available online: https://www.megasoftware.net (accessed on 3 September 2019).

International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife 14 (2021) 41–47

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijppaw

Molecular characterization of *Lipoptena cervi* from environmental samples collected in Poland

Remigiusz Gałęcki [a,*], Jerzy Jaroszewski [b], Tadeusz Bakuła [a], Xuenan Xuan [c]

[a] Department of Veterinary Prevention and Feed Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego 13, 10-719, Olsztyn, Poland
[b] Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego 13, 10-719, Olsztyn, Poland
[c] National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido, 080-8555, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:
16S rRNA gene
deer keds
Ectoparasite
Hippoboscidae
Louse flies
Phylogeny
PCR
Sequencing

ABSTRACT

The activity of *Lipoptena cervi* has intensified in Poland in recent years. The population genetics of this ectoparasite in Poland has never been described in the literature. The objectives of this study were to investigate the population genetics of *L. cervi* in selected regions of Poland, to evaluate molecular differences between *L. cervi* populations, and to determine phylogenetic relationships with other *L. cervi* sequences obtained in previous studies. In 2019, louse flies were sampled in natural mixed forests in five Polish voivodeships. Seven samples of *L. cervi* were collected from each voivodeship, and a total of 35 insects were analyzed molecularly. In the first step, *Lipoptena* spp. were identified to species level under a stereoscopic microscope. A fragment of the rRNA 16S gene was used as a marker to identify *L. cervi* by the PCR assay. The sequences were assigned accession numbers MT337409 to MT337416. A total of eight haplotypes were identified, two of which were dominant. In the obtained sequences, intraspecific pairwise genetic distances varied between 0.000 and 0.0496 ($m = 0.0135$; $SD = 0.0149$; $SE = 0.0006$; $V = 110.11$). Mean interpopulation diversity was $d = 0.0135$ ($SE = 0.0027$). The acquired nucleotide sequences were highly similar to the sequences from the Czech Republic (MF495940, AF322437), Lithuania (MN889542-MN889544) and Poland (MF541726–MF541729). The similarity with GenBank sequences ranged from 97.24% to 100%. This study revealed two dominant haplotypes of *L. cervi* in Poland, MT337410 and MT337413. Fragments of the analyzed sequences were detected in only one voivodeship. These findings suggest that the two dominant sequences are the oldest sequences that gave rise to the locally identified haplotypes. The lack of significant correlations with the sequences obtained in regions situated west of the research sites suggests the presence of other genetic populations in Europe.

1. Introduction

The population of wild ungulates has been increasing steadily in Poland. The high increase in the number of cervids is particularly noteworthy (Zalewski et al. 2018). These phenomena also affect the populations of interacting species, especially ectoparasites (Madslien et al., 2012). Deer keds are parasites with a narrow host range, and they are directly associated with cervids (Härkönen et al., 2010). The activity of *Lipoptena* spp. has intensified in recent years, particularly in forests (Gałęcki et al. 2020). Keds are obligatory hematophagous ectoparasites of birds and mammals which reproduce by adenotrophic viviparity. The genus *Lipoptena* spp. belongs to the family Hippoboscidae and consists of 32 species (Dick, 2006). The species important for veterinary medicine include *Lipoptena capreoli*, *Lipoptena cervi*, *Lipoptena depressa*, *Lipoptena fortisetosa*, *Lipoptena mazamae* and *Neolipoptena ferrisi*. When keds find a definitive host, their wings are broken off at the base, leaving behind a stump (Lloyd, 2009).

Lipoptena cervi is an indigenous species of the Palearctic region. Its presence in Central and Northern Europe has been described in detail. *Lipoptena cervi* populations have been reported from Algeria, Great Britain and northern China and the Eastern United States (Skvarla and Machtinger, 2019). The northern distribution limit currently lies at approximately 65°N, and it is gradually moving northwards (Hackman, 1979; Hackman et al., 1983). *Lipoptena cervi* colonizes only wild ruminants which are specific host species for that ectoparasite. This animals also play an important role in the spread of *L. cervi* because keds can

* Corresponding author.
E-mail address: remigiusz.galecki@uwm.edu.pl (R. Gałęcki).

https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.12.005
Received 26 October 2020; Received in revised form 19 December 2020; Accepted 19 December 2020
Available online 25 December 2020
2213-2244/© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of Australian Society for Parasitology. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

cover a distance of up to 50 m in the search for a host (Paakkonen, 2012). The life cycle of louse flies lasts up to 270–370 days with winter diapause in Europe, and it is determined mainly by climate conditions (Borowiec, 1984; McAlpine, 1987). Adult flies need to find a host soon after emergence to survive and breed. Host-seeking flies are typically observed between August and October (Hackman et al., 1983) when high temperatures prevail.

The prevalence and severity of *L. cervi* infestations can be extremely high in cervids. In Poland, this ectoparasite has been detected in numerous cervids and other animals. Deer keds were identified in 64% of European roe deer (Kadulski, 1996), 76% of fallow deer, and 78% of European red deer (Szczurek and Kadulski, 2004). Louse flies were also found to colonize European bison (Izdebska, 2001). The presence of *L. cervi* was noted in non-specific hosts such as companion animals (Sokół and Gałęcki, 2017), as well as in livestock (Dehio et al., 2004). One host is colonized by 9.9 flies on average (Szczurek and Kadulski, 2004). However, Vikøren et al. (2008) found more than 16,000 deer keds in a single moose. In specific hosts, massive colonization by *L. cervi* can lead to severe alopecia (Madslien et al., 2011). Most animals infested by *L. cervi* develop skin lesions, including acute to chronic, multifocal to coalescing, and eosinophilic to lymphocytic dermatitis (Madslien et al., 2011). The presence of L. cervi on the Tyrolean Ötzi mummy dating back more than 5000 years suggests that this species was also a human parasite in the past (Gothe and Schöl, 1994). Nowadays, the incidental infestation of humans with *L. cervi* has also been reported (Härkönen et al., 2009; Kortet et al., 2010). Humans bitten by louse flies can develop dermatitis, allergic rhinoconjunctivitis or even anaphylactic shock (Rantanen et al., 1982; Laukkanen et al., 2005; Decastello and Farkas, 2010). According to Härkönen et al. (2009), the number of people who require medical treatment for deer ked dermatitis will continue to increase. *Lipoptena cervi* can also serve as a vector for the transmission of several pathogens, including *Anaplasma* spp., *Bartonella* spp. and *Trypanosoma* spp. (Böse and Petersen, 1991; Hornok et al., 2011; De Bruin et al., 2015).

Most research into *L. cervi* has been carried out in Fennoscandia. This ectoparasite has attracted little interest from Central European researchers after 2000. In Poland, research into *L. cervi* was discontinued, and advanced research techniques, such as molecular biology tools, have been used on a small scale only (Szewczyk et al., 2017). *Lipoptena cervi* is unable to cross long distances, and it may form isolated populations when cervid migrations occur on a small scale. Trout et al. (2010) observed certain similarities between *Lipoptena* spp. and *Glossina* spp., including low reproductive rates and habitat limitations due to host preferences, and concluded that *Lipoptena* spp. populations should be characterized by pronounced genetic variation. In Poland, there is a general scarcity of evidence for genetic variation within *L. cervi* populations in distinct niches. Kurina et al. (2019) have argued that the precise identification, distribution and bionomics of *L. cervi* are of utmost importance for animal and human health, and imperative for vector control. Research into *L. cervi* seems to be justified due to the potential migration of host species between countries. A better understanding of deer ked haplotypes in Central Europe would support the identification of potential pathogens that are transmitted between migrating deer populations.

In view of the above, the objectives of this study were to investigate the population genetics of *L. cervi*, to evaluate molecular differences between *L. cervi* populations, and to determine phylogenetic relationships with other *L. cervi* sequences obtained in previous studies.

2. Materials and methods

2.1. Collection of deer ked samples

Louse flies were collected in 2019 in natural mixed forests in Poland. The study was conducted in five voivodeships: Greater Poland, Kuyavia-Pomerania, Lubusz, Pomerania, and Warmia-Masuria. A detailed map of the surveyed regions is presented in Fig. 1. *Lipoptena cervi* imagines were sampled from randomly selected forest complexes in each voivodeship. Scots pine was the predominant tree species in the studied areas. The underwood and undergrowth consisted of plant species typical of the Polish climate and geographic zone. Fresh traces of cervid, including red deer and European roe deer, were found in each location. Keds were collected by the investigators during walks in forests. The investigators wore brown cotton clothing covering the entire body, and they collected samples immediately after keds had landed on clothing. The obtained samples were placed in separate test tubes filled with 70% ethanol. Seven samples of *L. cervi* were collected from each voivodeship for further analyses.

2.2. Species identification

The collected samples were transported to the Biological Hazard Laboratory at the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn. Ked species was identified based on morphological characteristics under the Leica M165C stereoscopic microscope (Leica, Wetzlar, Germany). Measurements were carried out with the use of Leica Application Suite 4.4 (Leica, Wetzlar, Germany). Deer keds were identified to species level based on body dimensions, wing venation, length and structure of palpi, and the number of erect hairs on the mesonotum (Borowiec, 1984; Maa, 1969; Andreani et al., 2019).

2.3. DNA extraction

Seven *L. cervi* samples (n = 35) from each voivodeship were randomly selected for molecular analyses. In the first step, keds were air-dried for 15 min and then individually crushed with a sterile rod in sterile Eppendorf tubes. Genomic DNA was extracted from each specimen with the Sherlock AX universal kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) according to the manufacturer's instructions. DNA was eluted in 40 μL of TE buffer, and the concentration of the extracts was checked using the Nano Drop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The extracted DNA was stored at −20 °C until analysis.

2.4. PCR reaction

A fragment of the mitochondrial 16S rRNA gene of *Lipoptena* spp. with an estimated length of 412 bp was amplified by PCR. The PCR primers designed by Szewczyk et al. (2017) were used in amplification: L700F (5′-AAAGTTTAACCTGCCCACTGAT-3′) and L1213R (5′-CTGAACTCAGATCACGTAAGAAT -3′). The following cycling conditions were applied: initial denaturation at 92 °C for 3 min, 35 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 60 °C for 10 s, extension at 68 °C for 30 s, followed by final extension at 68 °C for 5 min (Szewczyk et al. 2017). Each reaction was performed in a final volume of 25 μl containing 2.5 μl of 10X Standard Taq Reaction Buffer (Biolabs, USA), 0.5 μl of 10 mM dNTPs (Biolabs, USA), 0.5 μl of 10 μM of each primer, 1 μl of *L. cervi* DNA template, 0.125 μl of Taq DNA Polymerase (Biolabs, USA), and 19.875 μl of double distilled water as a negative control. The PCR products were electrophoresed on a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and viewed under a UV transilluminator.

2.5. Sequencing

After the PCR reaction, DNA samples were purified by the ethanol precipitation method described by Weinberger (2000). Using a previously described primer set (L700F/L1213R), cycle sequencing was performed with the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the results were analyzed with the ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The obtained nucleotide sequences were edited in BioEdit software (Hall, 1999) and compared with the data registered in the

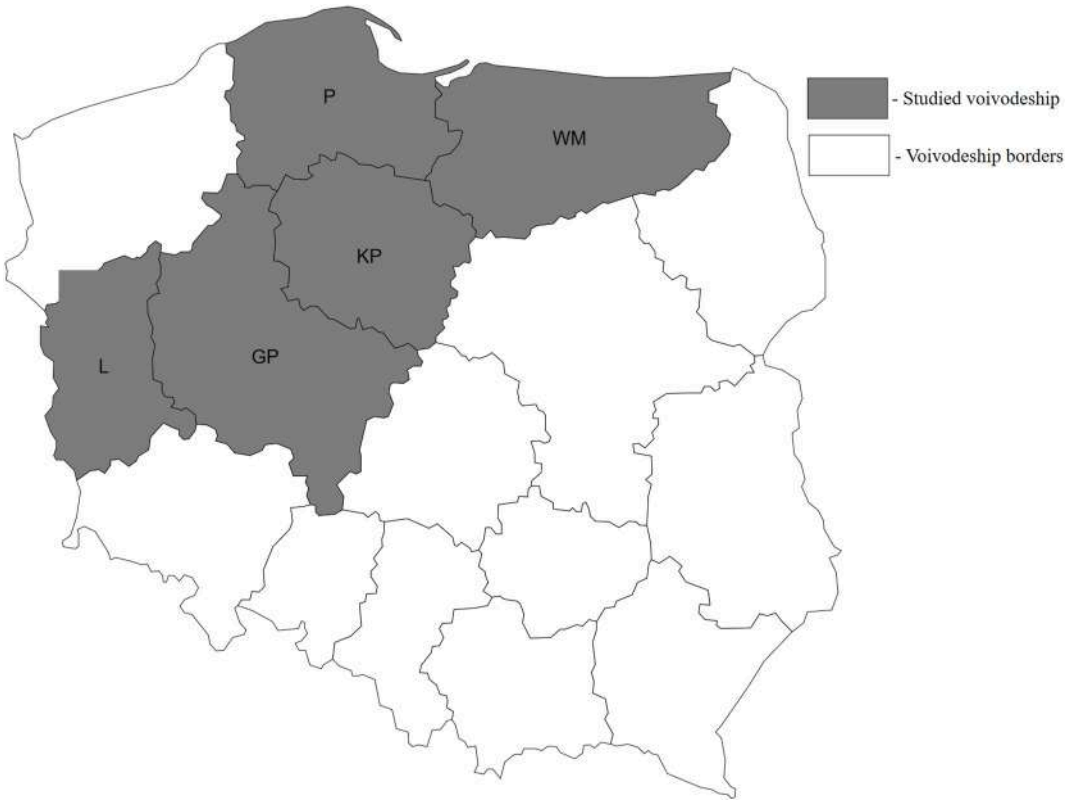


Fig. 1. Map of Poland with highlighted voivodships where *Lipoptena cervi* samples were collected.
Legend: GP - Greater Poland voivodeship; KP - Kuyavia-Pomerania voivodeship; L - Lubusz voivodeship; P - Pomerania voivodeship; WM - Warmia-Masuria voivodeship.

GenBank database using the BLAST-NCBI program. Phylogenetic analyses of the obtained rRNA 16S gene sequences and homologous GenBank sequences were performed using the maximum likelihood method in MEGA 10.1.17 (https://www.megasoftware.net) Bootstrap confidence values for branching reliability were calculated in 10,000 replicates. The sequences obtained from GenBank are listed in Table 1.

2.6. Nucleotide sequence accession numbers

The representative sequences of *L. cervi* obtained in this study were deposited in the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information. The sequences were assigned accession numbers MT337409 to MT337416.

Table 1
Sequences used in the phylogenetic analysis.

Sequence ID	Species	Country of isolation	Reference
MT337409- MT337416	*Lipoptena cervi*	Poland	Current study
MF541726–MF541729*	*Lipoptena cervi*	Poland	Szewczyk et al. (2017)
MF495940	*Lipoptena cervi*	Czech Republic	Sochova et al. (2017)
AF322437	*Lipoptena cervi*	Czech Republic	Nirmala et al. (2001)
DQ133043	*Lipoptena cervi*	Germany	Dittmar et al. (2006)
MN889542- MN889544	*Lipoptena cervi*	Lithuania	Radzijevskaja et al. (2020)
EF531114	*Lipoptena cervi*	Denmark	Petersen et al. (2007)

Legend: *- sequences obtained in studied locations (Warmia-Masuria voivodeship).

2.7. Statistical analysis

Descriptive statistics, including the mean (m), standard deviation (SD) and variation (V), were calculated in the Statistica 13.3 program (TIBCO Software Inc., Palo Alto, USA). Intraspecific pairwise genetic distances, mean interpopulation diversity, mean genetic distances, standard error (SE), mean evolutionary distance, and nucleotide frequencies were calculated in MEGA 10.1.17 (https://www.megasoftware.net). Bootstrap confidence intervals were calculated in 10,000 replicates.

3. Results

Three haplotypes (MT337410, MT337413, MT337416) were detected in the Greater Poland voivodeship. Four haplotypes were found in the Kuyavia-Pomerania voivodeship (MT337409, MT337410, MT337413, MT337415). Three haplotypes were acquired in the Lubusz voivodeship (MT337410, MT337412, MT337413). Three haplotypes were identified in the Pomerania voivodeship (MT337410, MT337413, MT337414), and two (MT337410, MT337411) – in the Warmia-Masuria voivodeship. The detailed distribution of haplotypes in the examined locations is presented in Table 2.

In the obtained sequences, intraspecific pairwise genetic distances varied between 0.000 and 0.0496 ($m = 0.0135$; $SD = 0.0149$; $SE = 0.0006$; $V = 110.11$). Mean interpopulation diversity was $d = 0.0135$ ($SE = 0.0027$). Mean genetic distances within voivodeships were: $d = 0.013$ ($SE = 0.003$) for the Greater Poland voivodeship; $d = 0.004$ ($SE = 0.002$) for the Kuyavia-Pomerania voivodeship; $d = 0.018$ ($SE = 0.004$) for the Lubusz voivodeship; $d = 0.021$ ($SE = 0.005$) for the Pomerania voivodeship; and $d = 0.007$ ($SE = 0.003$) for the Warmia-Masuria voivodeship. Mean genetic distances between voivodeships are presented in Table 3. The mean evolutionary rates in these categories were 0.00,

Table 2
Molecular characterization of *Lipoptena cervi* in the studied sites.

No. of *Lipoptena cervi* haplopypes in examided voivodeships					
Detected haplotypes	Greater Poland (n = 7)	Kuyavia-Pomerania (n = 7)	Lubusz (n = 7)	Pomerania (n = 7)	Warmia-Masuria (n = 7)
MT337409	–	1	–	–	–
MT337410	4	3	3	3	5
MT337411	–	–	–	–	2
MT337412	–	–	2	–	–
MT337413	2	1	2	3	–
MT337414	–	–	–	1	–
MT337415	–	2	–	–	–
MT337416	1	–	–	–	–

Table 3
Mean genetic distances of *Lipoptena cervi* between voivodeships.

Studied voivodeships	GP	Mean genetic distance (d)		P	WM
		KP	L		
GP (n = 7)	–	–	–	–	–
KP (n = 7)	0.0083	–	–	–	–
L (n = 7)	0.0159	0.0125	–	–	–
P (n = 7)	0.0199	0.0165	0.0174	–	–
WM (n = 7)	0.0099	0.0062	0.0136	0.0169	–

Legend: GP - Greater Poland voivodeship; KP - Kuyavia-Pomerania voivodeship; L - Lubusz voivodeship; P - Pomerania voivodeship; WM - Warmia-Masuria voivodeship; n - number of samples.

0.00, 0.00, 0.03 and 4.97 substitutions per site. Nucleotide frequencies were determined at: A = 37.55%, T = 38.82%, C = 9.54%, and G = 14.10%.

Eight sequences (MT337409- MT337416) were characterized by 97.24%% to 100% similarity with *L. cervi* sequences from the Poland and Lithuania (MF541726, MF541729, MN889544, MN889544). No similarities were found between the identified sequences and the haplotypes from Denmark and Germany (Dittmar et al., 2006; Petersen et al., 2007). Detailed data, including the ID of the closest match, country of origin, and percent sequence identity, are presented in Table 4. Phylogenetic trees are presented in Figs. 2 and 3.

4. Discussion

This study revealed two dominant haplotypes of *L. cervi* (MT337410 and MT337413) in Poland. These haplotypes were found in nearly all studied regions. Some sequences were detected in only one voivodeship.

Table 4
Comparison of the acquired sequences with GenBank sequences.

Sequence ID	Closest match ID	Country of origin	Percentage match	Reference
MT337409	MF541726	Poland	99.51%	Szewczyk et al. (2017)
	MN889542	Lithuania	99.58%	
MT337410	MF541726	Poland	100%	Radzijevskaja et al. (2020)
	MN889544	Lithuania	100%	
MT337411	MF541729	Poland	99.51%	
	MN889544	Lithuania	99.36%	
MT337412	MF541726	Poland	97.46%	
	MN889542	Lithuania	97.24%	
MT337413	MF541726	Poland	100%	
	MN889542	Lithuania	99.79%	
MT337414	MF541726	Poland	100%	
	MN889542	Lithuania	99.79%	
MT337415	MF541726	Poland	100%	
	MN889542	Lithuania	99.79%	
MT337416	MF541726	Poland	98.06%	
	MN889544	Lithuania	98.01%	

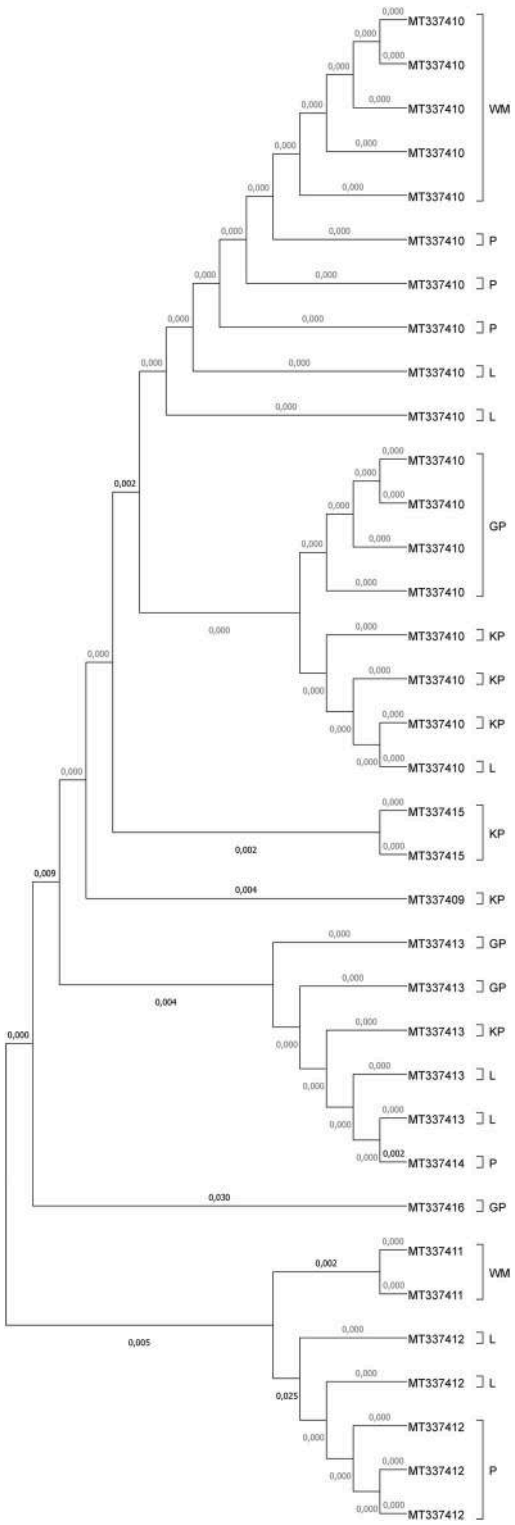


Fig. 2. Phylogenetic analysis of the rRNA 16S gene in the examined sequences of *Lipoptena cervi* from the studied voivodships.
Legend: Phylogenetic topology for the maximum likelihood analysis of the partial rRNA 16S gene sequence of *Lipoptena cervi*. The unique haplotypes identified in the study are labeled with the corresponding sequence identification numbers. Bootstrap confidence values for branching reliability were calculated in 10,000 replicates. G - Greater Poland voivodeship; KP - Kuyavia-Pomerania voivodeship; L - Lubusz voivodeship; P - Pomerania voivodeship; WM - Warmia-Masuria voivodeship.

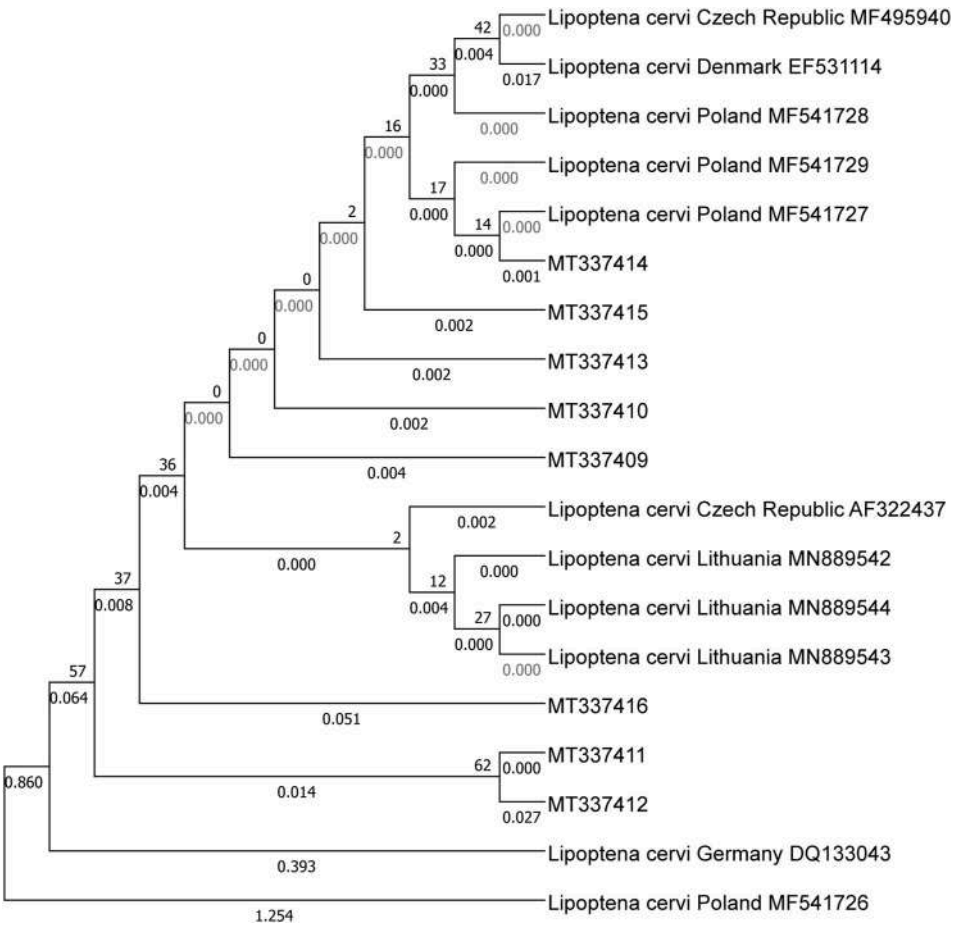


Fig. 3. Phylogenetic analysis of the rRNA 16S gene in *Lipoptena cervi* relative to other sequences.
Legend: Phylogenetic topology for the maximum likelihood analysis of the partial rRNA 16S gene sequence of *Lipoptena cervi*. The unique haplotypes identified in this study are labeled with the corresponding sequence identification numbers. The reference sequences available in GenBank are indicated in the tree. Bootstrap confidence values for branching reliability were calculated in 10,000 replicates.

These findings suggest that the two dominant sequences are the oldest sequences that gave rise to the locally identified haplotypes. These haplotypes probably spread throughout Poland and evolved independently, by natural selection, into the sequences obtained in this study. This observation is supported by the differences in the analyzed gene. The expansion of louse flies is boundless in the temperate climate (due to the potential migration of cervids); therefore, the population and diversity of keds could be nearly identical in the studied locations (despite individual mutations). New local haplotypes are likely to be discovered in the future due to low reproductive rates and habitat limitations resulting from host preferences (Trout et al., 2010). It should also be noted that the genetic diversity of the *L. cervi* population in Central Europe suggests the presence of common ancestors and continuous migrations (gene flows) across countries. The above could also be attributed to limited panmixia because reproduction occurs only among individuals colonizing the same host. The presence of stable L. cervi populations in some areas probably induced genetic selection that was influenced by environmental factors and the availability of host species. The above suggests that *L. cervi* easily adapt to new ecosystems. Very close similarities were observed between the studied sequences of *L. cervi* and the sequences from the Czech Republic, Lithuania and Poland deposited in GenBank (Nirmala et al., 2001; Szewczyk et al., 2017; Sochova et al., 2017; Radzijevskaja et al., 2020). Interestingly, the sequences from Germany and Denmark (Dittmar et al., 2006; Petersen et al., 2007) did not match the current results, which could point to the presence of genetically different populations in Europe. However, only several 16S marker sequences of the studied ectoparasite are available in GenBank, and few haplotypes are geographically limited.

Molecular differences have been observed between *Lipoptena* spp. species despite the fact that the 16S rRNA gene is relatively resistant to genetic variation. Genetic variation was reported by Trout et al. (2010) in a study of *Lipoptena mazamae*. They identified six unique haplotypes by amplifying 16S markers in the PCR assay. Similar observations have been made in other ectoparasites, including bed bugs, tsetse flies and ticks (Krafsur et al., 2000; Szalanski et al., 2008; Kulakova et al., 2014; Livanova et al., 2015). These species as well as *L. cervi* are characterized by considerable population fragmentation, which can lead to isolation and genetic aberration. For this reason, the use of the 16S rRNA gene in analyses of genetic diversity within limited populations seems to be justified. In the future, the results of this study should be validated by analyzing genetic variation in the cytochrome c oxidase I (COX1) gene of *L. cervi* in Poland. An analysis of the correlations between COX1 and 16S rRNA gene sequences could also deliver new insights.

Population studies seem to be relevant because *L. cervi* is an underestimated vector of veterinary importance. This parasite is not fully understood from the epidemiological point of view. The potential flow of pathogens across regions could be predicted be examining the results of population genetics studies and the transfer of infectious agents by selected haplotypes. A thorough knowledge of the genetic profile of *L. cervi* combined with pathogen detection would support the identification of potential high-risk areas. Further research is needed due to the steady increase in *L. cervi* population. The presence of *L. cervi* on non-specific hosts or in non-specific locations (such as cities) could also indicate that the species rapidly assimilates to new environmental conditions. The above could be correlated with specific haplotypes that better adapt to non-specific ecosystems. Migratory processes could contribute to the spread of new pathogens to previously uncolonized areas, including human settlements. Previous studies of Hippoboscidae confirmed that pathogens could be horizontally transmitted. Bacteria of the genera *Bartonella* spp., *Borrelia* spp. and *Coxiella*-like bacteria have

been identified in *Lipoptena* spp., but the ectoparasite's ability to transmit pathogens has been confirmed only for *Bartonella* spp. (Doby et al., 1994; Hulinsky et al., 2002; Hornok et al., 2011; De Bruin et al., 2015; Korhonen et al., 2015; Lee et al., 2016). Protozoa such as *Anaplasma phagocytophilum* and *A. ovis*, *Theileria luwenshuni*, *T. ovis* and *Trypanosoma* spp. have also been found in these insects (Böse and Petersen, 1991; Hornok et al., 2011; Víchová et al., 2011; Lee et al., 2016). However, this problem requires more detailed research.

The population of *L. cervi* can be expected to rise in Central Europe due to climate change and an increase in host populations. According to Härkönen et al. (2010), the increase in winter and summer temperatures associated with global warming enhances the performance of *L. cervi* and prolongs its flight period. In the studied regions, high winter and summer temperatures could potentially intensify the migration of this ectoparasite species to human settlements. However, further research is needed to confirm this assumption. Higher temperatures could significantly affect the parasite's developmental cycle by shortening winter diapause, altering the phenology of *L. cervi,* and increasing its population due to lower mortality in winter. The steady rise in the deer population in Poland also increases the availability of feed for deer keds. In order to survive, newly-emerged imagines of *L. cervi* have to rapidly find a host. This ectoparasite travels short distances (up to 50 m) in the search of a host, which is why an increase in the density of the wild ungulate population can also reduce mortality associated with the lack of hosts. Cervid migrations play a significant role in the spread of *L. cervi*. This ectoparasite can survive for more than a year on the host (Härkönen et al. 2010); therefore, the new generation may develop even in distant locations. In this study, the above was observed in the two most commonly detected haplotypes. It should also be noted that the related species of *L. fortisetosa* has been identified in Central Europe (Andreani et al., 2019; Gałęcki et al., 2020). In the future, efforts should be made to differentiate between *L. cervi* and *L. fortisetosa,* and to explore potential hybridization between these two closely related species. Due to the apparent physiological similarities and similar activity patterns of *L. cervi* and *L. fortisetosa* (Oboňa et al., 2019) incorrect identification could produce misleading results in future research.

5. Conclusions

The present study reveal genetic variation in the 16S rRNA gene of the *L. cervi* population in selected Polish voivodeships. The studied regions were colonized by two dominant haplotypes of *L. cervi* that have been identified in other Central European countries, and local haplotypes were detected in individual cases. The lack of significant correlations with the sequences obtained in regions situated west of the research sites suggests the presence of other genetic populations in Europe. In the future, the population genetics of *L. cervi* should be investigated in greater detail to contribute to the development of preventive programs aiming to reduce ectoparasitic populations in the environment and minimize the negative impact of *L. cervi* on wild animals, livestock and humans.

Funding

Project financially co-supported by the Minister of Science and Higher Education under the program entitled "Regional initiative of Excellence" for the years 2019–2022, Project No. 010/RID/2018/19, amount of funding PLN 12,000,000. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Declaration of competing interestCOI

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the "Healthy Animal - Safe Food" Scientific Consortium of the Leading National Research Center (KNOW) (grant No. 05-1/KNOW2/2015) for supporting cooperation between the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn and the National Research Center for Protozoan Diseases of the Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine.

References

Andreani, A., Sacchetti, P., Belcari, A., 2019. Comparative morphology of the deer ked *Lipoptena fortisetosa* first recorded from Italy. Med. Vet. Entomol. 33, 140–153.
Borowiec, L., 1984. Klucze do oznaczania owadów Polski. In: Część XXVIII. Muchówki - Diptera. Zeszyt 77, Wpleszczowate - Hippoboscidae. PWN Warszawa, pp. 3–35, 1984.
Böse, R., Petersen, K., 1991. *Lipoptena cervi* (Diptera), a potential vector of Megatrypanum trypanosomes of deer (Cervidae). Parasitol. Res. 77, 723–725.
De Bruin, A., Van Leeuwen, A.D., Jahfari, S., Takken, W., Földvári, M., Dremmel, L., Sprong, H., Földvári, G., 2015. Vertical transmission of *Bartonella schoenbuchensis* in *Lipoptena cervi*. Parasites Vectors 8, 176.
Decastello, A., Farkas, R., 2010. Anaphylactic reaction following forest fly (*Hippobosca equina*) bite: a human case. Clin. Exp. Med. J. 4, 193–198.
Dehio, C., Sauder, U., Hiestand, R., 2004. Isolation of *Bartonella schoenbuchensis* from *Lipoptena cervi*, a blood-sucking arthropod causing deer ked dermatitis. J. Clin. Microbiol. 42, 5320–5323.
Dick, C.W., 2006. Checklist of World Hippoboscidae (Diptera: Hippoboscoidea). Department of Zoology, Field Museum Natural History, Chicago, IL, pp. 1–7.
Dittmar, K., Porter, M.L., Murray, S., Whiting, M.F., 2006. Molecular phylogenetic analysis of nycteribiid and streblid bat flies (Diptera: brachycera, Calyptratae): implications for host associations and phylogeographic origins. Mol. Phylogenet. Evol. 38, 155–170.
Doby, J.M., Bigaignon, G., Degeilh, B., Guiguen, C., 1994. Ectoparasites of large wild mammals (deer and wild boars) and Lyme borreliosis. Search for *Borrelia burgdorferi* in more than 1400 ticks, lice, Pupipara, Diptera and fleas. Rev. Med. Vet-Toulouse. 145, 743–748.
Gałęcki, R., Jaroszewski, J., Xuan, X., Bakuła, T., 2020. Temporal-microclimatic factors affect the phenology of Lipoptena fortisetosa in central European forests. Animals 10, 2012.
Gothe, R., Schöl, H., 1994. Deer keds (*Lipoptena cervi*) in the accompanying equipment of the late neolithic human mummy from the similaun, south tyrol. Parasitol. Res. 80, 81–83.
Hackman, W., 1979. The colonization of Finland by the deer ked, *Lipoptena cervi* L.(Dipt., Hippoboscidae). Entomol. Tidskr. 100, 209–210.
Hackman, W., Rantanen, T., Vuojolahti, R., 1983. Immigration of *Lipoptena cervi* (Diptera, Hippoboscidae) in Finland, with notes on its biology and medical significance. Not. Entomol. 63, 53–59.
Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41, 95–98.
Härkönen, S., Laine, M., Vornanen, M., Reunala, T., 2009. Deer ked (*Lipoptena cervi*) dermatitis in humans–an increasing nuisance in Finland. Alces 45, 73–79.
Härkönen, L., Härkönen, S., Kaitala, A., Kaunisto, S., Kortet, R., Laaksonen, S., Ylönen, H., 2010. Predicting range expansion of an ectoparasite–the effect of spring and summer temperatures on deer ked *Lipoptena cervi* (Diptera: Hippoboscidae) performance along a latitudinal gradient. Ecography 33, 906–912.
Hornok, S., De La Fuente, J., Biró, N., Fernández de Mera, I.G., Meli, M.L., Elek, V., Gönczi, E., Meili, T., Tánczos, B., Farkas, R., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2011. First molecular evidence of *Anaplasma ovis* and *Rickettsia* spp. in keds (Diptera: Hippoboscidae) of sheep and wild ruminants. Vector Borne Zoonotic Dis. 11, 1319–1321.
Hulinsky, V., Smetana, K., 2002. Molecular and microscopical evidence of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in patients, animals and ticks in the Czech Republic. Microbiol. 25, 437–448.
Izdebska, J.N., 2001. European bison arthropod parasites from closed Polish breeding facilities. Acta Parasitol. 46, 135–137.
Kadulski, S., 1996. Ectoparasites of cervidae in north-east Poland. Acta Parasitol. 41, 204–210.
Korhonen, E.M., Vera, C.P., Pulliainen, A.T., Sironen, T., Aaltonen, K., Kortet, R., Härkönen, L., Härkönen, S., Paakkonen, T., Nieminen, P., Mustonen, A.M., Ylönen, H., Vapalahti, O., 2015. Molecular detection of *Bartonella* spp. in deer ked pupae, adult keds and moose blood in Finland. Epidemiol. Infect. 143, 578–585.
Kortet, R., Härkönen, L., Hokkanen, P., Härkönen, S., Kaitala, A., Kaunisto, S., Laaksonen, S., Kekäläinen, J., Ylönen, H., 2010. Experiments on the ectoparasitic deer ked that often attacks humans; preferences for body parts, colour and temperature. Bull. Entomol. Res. 100, 279–285.
Krafsur, E.S., Madsen, M., Wohlford, D.L., Mihok, S., Griffiths, N.T., 2000. Population genetics of *Glossina morsitans submorsitans* (Diptera: Glossinidae). Bull. Entomol. Res. 90, 329–335, 2000.
Kulakova, N.V., Khasnatinov, M.A., Sidorova, E.A., Adel'shin, R.V., Belikov, S.I., 2014. Molecular identification and phylogeny of *Dermacentor nuttalli* (Acari: ixodidae). Parasitol. Res. 113, 1787–1793.

Kurina, O., Kirik, H., Õunap, H., Õunap, E., 2019. The northernmost record of a blood-sucking ectoparasite, *Lipoptena fortisetosa* Maa (Diptera: Hippoboscidae). Estonia. Biodivers. Data J. 7, e47857.

Laukkanen, A., Ruoppi, P., Mäkinen-Kiljunen, S., 2005. Deer ked-induced occupational allergic rhinoconjunctivitis. Ann. Allergy Asthma Immunol. 94, 604–608.

Lee, S.H., Kim, K.T., Kwon, O.D., Ock, Y., Kim, T., Choi, D., Kwak, D., 2016. Novel detection of *Coxiella* spp., *Theileria luwenshuni*, and *T. ovis* endosymbionts in deer keds (*Lipoptena fortisetosa*). PloS One 11, e0156727.

Livanova, N.N., Tikunov, A.Y., Kurilshikov, A.M., Livanov, S.G., Fomenko, N.V., Taranenko, D.E., Kvashnina, A.E., Tikunova, N.V., 2015. Genetic diversity of *Ixodes pavlovskyi* and *I. persulcatus* (Acari: ixodidae) from the sympatric zone in the south of Western Siberia and Kazakhstan. Exp. Appl. Acarol. 67, 441–456.

Lloyd, J.E., 2009. Louse flies, keds, and related flies (Hippoboscoidea). In: Mullen, G.R., Durden, L.A. (Eds.), Medical and Veterinary Entomology. Academic press, London, pp. 339–352.

Maa, T.C., 1969. A revised checklist and concise host index of Hippoboscidae (Diptera). Pac. Insects Monogr. 20, 261–299.

Madslien, K., Ytrehus, B., Vikøren, T., Malmsten, J., Isaksen, K., Hygen, H.O., Solberg, E. J., 2011. Hair-loss epizootic in moose (*Alces alces*) associated with massive deer ked (*Lipoptena cervi*) infestation. J. Wildl. Dis. 47, 893–906.

Madslien, K., Ytrehus, B., Viljugrein, H., Solberg, E.J., Bråten, K.R., Mysterud, A., 2012. Factors affecting deer ked (*Lipoptena cervi*) prevalence and infestation intensity in moose (Alces alces) in Norway. Parasites Vectors 5, 1–10.

McAlpine, J.F., 1987. Manual of Nearctic Diptera. Tom 2. Research Bra\, pp. 1271–1332.

https://www.megasoftware.net/. (Accessed 2 February 2020).

Nirmala, X., Hypša, V., Žurovec, M., 2001. Molecular phylogeny of Calyptratae (Diptera: brachycera): the evolution of 18S and 16S ribosomal rDNAs in higher dipterans and their use in phylogenetic inference. Insect Mol. Biol. 10, 475–485.

Oboňa, J., Sychra, O., Greš, S., Heřman, P., Manko, P., Roháček, J., Šestáková, A., Šlapák, J., Hromada, M., 2019. A revised annotated checklist of louse flies (Diptera, Hippoboscidae) from Slovakia. ZooKeys 862, 129–152.

Paakkonen, T., 2012. Ecophysiology of the Deer Ked (*Lipoptena cervi*) and its Hosts. PhD Thesis, vol. 2012. University of Eastern Finland. Available from: https://core.ac.uk/download/pdf/15169155.pdf. (Accessed 23 April 2020).

Petersen, F.T., Meier, R., Kutty, S.N., Wiegmann, B.M., 2007. The phylogeny and evolution of host choice in the Hippoboscoidea (Diptera) as reconstructed using four molecular markers. Mol. Phylogenet. Evol. 45, 111–122.

Radzijevskaja, J., Paulauskas, A., Klepeckiene, K., Razanske, I., Rosef, O.. Species diversity and molecular characterization of deer keds (genus *Lipoptena*) from cervids. Unpublished. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN889549. (Accessed 20 February 2020).

Rantanen, T., Reunala, T., Vojolahti, P., Hackman, W., 1982. Persistent pruritic papules from deer ked bites. Acta Dermatovener 62, 307–311.

Skvarla, M.J., Machtinger, E.T., 2019. Deer keds (Diptera: Hippoboscidae: Lipoptena and Neolipoptena) in the United States and Canada: new state and county records, pathogen records, and an illustrated key to species. J. Med. Entomol. 56, 744–760.

Šochová, E., Husník, F., Nováková, E., Halajian, A., Hypša, V., 2017. *Arsenophonus* and *Sodalis* replacements shape evolution of symbiosis in louse flies. Peer J 5, e4099.

Sokół, R., Gałęcki, R., 2017. Prevalence of keds on city dogs in central Poland. Med. Vet. Entomol. 31, 114–116.

Szalanski, A.L., Austin, J.W., McKern, J.A., Steelman, C.D., Gold, R.E., 2008. Mitochondrial and ribosomal internal transcribed spacer (ITS1) diversity of the bed bug *Cimex lectularius* L. (Heteroptera: cimicidae). J. Med. Entomol. 45, 229–236.

Szczurek, B., Kadulski, S., 2004. Ectoparasites on fallow deer, *dama* (L.) in Pomerania, Poland. Acta Parasitol. 49, 80–86.

Szewczyk, T., Werszko, J., Steiner-Bogdaszewska, Ż., Jeżewski, W., Laskowski, Z., Karbowiak, G., 2017. Molecular detection of *Bartonella* spp. in deer ked (*Lipoptena cervi*) in Poland. Parasites Vectors 10, 487.

Trout, R.T., Steelman, C.D., Szalanski, A.L., 2010. Phylogenetics and population genetics of the louse fly, *Lipoptena mazamae*, from Arkansas, USA. Med. Vet. Entomol. 24, 258–265.

Víchová, B., Majláthová, V., Nováková, M., Majláth, I., Čurlík, J., Bona, M., Komjáti-Nagyová, M., Peťko, B., 2011. PCR detection of re-emerging tick-borne pathogen, *Anaplasma phagocytophilum*, in deer ked (*Lipoptena cervi*) a blood-sucking ectoparasite of cervids. Biologia 66, 1082.

Vikøren, T., Lillehaug, A., Handeland, K., 2008. Helseovervakingsprogrammet for Hjortevilt (HOP), Årsrapport for 2006 Og 2007. National Veterinary Inst. Report Series, National Veterinary Inst, Oslo.

Weinberger, R., 2000. Practical Capillary Electrophoresis. Academic Press, San Diego, pp. 423–457.

Zalewski, D., Okarma, H., Panek, M., 2018. Monitoring Liczebności I Jakości Populacji Dzikich Zwierząt. Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Katedra Hodowli Zwierząt Futerkowych i Łowiectwa, Olsztyn, pp. 34–41.

URZĄD PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

al. Niepodległości 188/192
00-950 Warszawa, skr. poczt. 203
tel.: (+48) 22 579 05 55 | fax: (+48) 22 579 00 01
e-mail: kontakt@uprp.gov.pl | www.uprp.gov.pl

Kancelaria Ogólna

Warszawa, 2021-12-14

Nasz znak: POTWIERDZENIE/188997/
Wasz znak: L.dz.UWM-RP/154/2021

POTWIERDZENIE

Urząd Patentowy RP stwierdza, że dnia 2021-12-14 przyjęto w formie elektronicznej wniosek o udzielenie patentu na wynalazek:

Zastosowanie strzyżaków jako biologicznych markerów do wykrywania chorób przenoszonych przez wektory u jeleniowatych

Zgłoszenie oznaczono numerem: **P.439829**

[WIPO ST 10/C PL439829]

Zgłaszający: **Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Olsztyn, Polska**

Dokument wystawiony automatycznie przez system teleinformatyczny UPRP.

Pouczenie:

1. Strony oraz ich przedstawiciele i pełnomocnicy mają obowiązek zawiadomić Urząd o każdej zmianie swojego adresu. W razie zaniedbania tego obowiązku doręczenie pisma pod dotychczasowym adresem ma skutek prawny (art. 41 kpa).
2. O zgłoszeniu wynalazku Urząd Patentowy dokonuje ogłoszenia niezwłocznie po upływie 18 miesięcy od daty pierwszeństwa do uzyskania patentu. Zgłaszający może w okresie 12 miesięcy od daty pierwszeństwa złożyć wniosek o dokonanie ogłoszenia w terminie wcześniejszym (art. 43 ustawy z dnia 30 czerwca 2000r. Prawo własności przemysłowej (Dz. U. z 2021 r. poz. 324).
3. W korespondencji należy powoływać się na nr P.439829.

Klauzula informacyjna:
Zgodnie z art. 13 ust. 1 i 2 Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2016/679 z dnia 27 kwietnia 2016 r. w sprawie ochrony osób fizycznych w związku z przetwarzaniem danych osobowych i w sprawie swobodnego przepływu takich danych oraz uchylenia dyrektywy 95/46/WE (dalej RODO) Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej informuje, że:

1. Administratorem Pani/Pana danych osobowych jest Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej z siedzibą w Warszawie, adres: al. Niepodległości 188/192, 00-950 Warszawa, skrytka pocztowa 203;
2. Inspektor Ochrony Danych, dane kontaktowe: adres: al. Niepodległości 188/192, 00-950 Warszawa, tel. bezpośredni (022) 579 00 25, fax (022) 579 00 01, e-mail: iod@uprp.pl;

3. Pani/Pana dane osobowe przetwarzane będą w celu realizowania zadań Urzędu Patentowego RP określonych przepisami ustawy z dnia 30 czerwca 2000 r. Prawo własności przemysłowej;
4. Podstawą prawną przetwarzania Pani/Pana danych osobowych jest ustawa z dnia 30 czerwca 2000 r. Prawo własności przemysłowej, rozporządzenia wykonawcze do ww. ustawy, umowy międzynarodowe oraz art. 6 ust. 1 lit. c RODO;
5. Pani/Pana dane osobowe mogą być przekazywane do podmiotów publicznych na zasadach obowiązujących w przepisach prawa oraz organizacjom międzynarodowym i organom unijnym, zgodnie z obowiązującymi przepisami prawa i umowami międzynarodowymi, po upływie terminów zastrzeżonych dla nieujawniania informacji o zgłoszeniu;
6. Pani/Pana dane osobowe będą przechowywane przez okres zgodny z zasadami archiwizacji dokumentów w Urzędzie Patentowym RP;
7. Posiada Pani/Pan prawo żądania dostępu do treści swoich danych osobowych, prawo ich sprostowania oraz prawo do ograniczenia ich przetwarzania;
8. Przysługuje Pani/Panu prawo wniesienia skargi do organu nadzorczego właściwego w zakresie ochrony danych osobowych gdy uzna Pani/Pan, że przetwarzanie Pani/Pana danych osobowych narusza przepisy RODO;
9. Podanie przez Panią/Pana danych osobowych jest wymogiem ustawowym niezbędnym do dalszego procedowania przez Urząd Patentowy RP.

W celu weryfikacji autentyczności korespondencji zeskanuj podany kod QR lub przejdź na stronę weryfikacji korespondencji Urzędu Patentowego RP dostępnej pod adresem **https://pue.uprp.gov.pl/public/stamp/verify** i przepisz kod stempla.

Kod stempla: 98c-a82c-b98

URZĄD PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

al. Niepodległości 188/192
00-950 Warszawa, skr. poczt. 203
tel.: (+48) 22 579 05 55 | fax: (+48) 22 579 00 01
e-mail: kontakt@uprp.gov.pl | www.uprp.gov.pl

Kancelaria Ogólna

Warszawa, 2021-12-20

Nasz znak: POTWIERDZENIE/190984/P.439910
Wasz znak: L.dz. UWM_RP/157/2021

POTWIERDZENIE

Urząd Patentowy RP stwierdza, że dnia 2021-12-20 przyjęto w formie elektronicznej wniosek o udzielenie patentu na wynalazek:

Pojemniki do przetrzymywania i transportu ektopasożytów, zwłaszcza muchówek z rodziny Hippoboscidae ze środowiska naturalnego

Zgłoszenie oznaczono numerem: **P.439910**
[WIPO ST 10/C PL439910]

Zgłaszający: **Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Olsztyn, Polska**

Dokument wystawiony automatycznie przez system teleinformatyczny UPRP.

Pouczenie:

1. Strony oraz ich przedstawiciele i pełnomocnicy mają obowiązek zawiadomić Urząd o każdej zmianie swojego adresu. W razie zaniedbania tego obowiązku doręczenie pisma pod dotychczasowym adresem ma skutek prawny (art. 41 kpa).
2. O zgłoszeniu wynalazku Urząd Patentowy dokonuje ogłoszenia niezwłocznie po upływie 18 miesięcy od daty pierwszeństwa do uzyskania patentu. Zgłaszający może w okresie 12 miesięcy od daty pierwszeństwa złożyć wniosek o dokonanie ogłoszenia w terminie wcześniejszym (art. 43 ustawy z dnia 30 czerwca 2000r. Prawo własności przemysłowej (Dz. U. z 2021 r. poz. 324).
3. W korespondencji należy powoływać się na nr P.439910.

Klauzula informacyjna:
Zgodnie z art. 13 ust. 1 i 2 Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2016/679 z dnia 27 kwietnia 2016 r. w sprawie ochrony osób fizycznych w związku z przetwarzaniem danych osobowych i w sprawie swobodnego przepływu takich danych oraz uchylenia dyrektywy 95/46/WE (dalej RODO) Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej informuje, że:

1. Administratorem Pani/Pana danych osobowych jest Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej z siedzibą w Warszawie, adres: al. Niepodległości 188/192, 00-950 Warszawa, skrytka pocztowa 203;
2. Inspektor Ochrony Danych, dane kontaktowe: adres: al. Niepodległości 188/192, 00-950 Warszawa, tel. bezpośredni (022) 579 00 25, fax (022) 579 00 01, e-mail: iod@uprp.pl;

3. Pani/Pana dane osobowe przetwarzane będą w celu realizowania zadań Urzędu Patentowego RP określonych przepisami ustawy z dnia 30 czerwca 2000 r. Prawo własności przemysłowej;
4. Podstawą prawną przetwarzania Pani/Pana danych osobowych jest ustawa z dnia 30 czerwca 2000 r. Prawo własności przemysłowej, rozporządzenia wykonawcze do ww. ustawy, umowy międzynarodowe oraz art. 6 ust. 1 lit. c RODO;
5. Pani/Pana dane osobowe mogą być przekazywane do podmiotów publicznych na zasadach obowiązujących w przepisach prawa oraz organizacjom międzynarodowym i organom unijnym, zgodnie z obowiązującymi przepisami prawa i umowami międzynarodowymi, po upływie terminów zastrzeżonych dla nieujawniania informacji o zgłoszeniu;
6. Pani/Pana dane osobowe będą przechowywane przez okres zgodny z zasadami archiwizacji dokumentów w Urzędzie Patentowym RP;
7. Posiada Pani/Pan prawo żądania dostępu do treści swoich danych osobowych, prawo ich sprostowania oraz prawo do ograniczenia ich przetwarzania;
8. Przysługuje Pani/Panu prawo wniesienia skargi do organu nadzorczego właściwego w zakresie ochrony danych osobowych gdy uzna Pani/Pan, że przetwarzanie Pani/Pana danych osobowych narusza przepisy RODO;
9. Podanie przez Panią/Pana danych osobowych jest wymogiem ustawowym niezbędnym do dalszego procedowania przez Urząd Patentowy RP.

W celu weryfikacji autentyczności korespondencji zeskanuj podany kod QR lub przejdź na stronę weryfikacji korespondencji Urzędu Patentowego RP dostępnej pod adresem
https://pue.uprp.gov.pl/public/stamp/verify
i przepisz kod stempla.

Kod stempla: 1a8-e2ba-a54