



Klinika Chorób Zakaźnych, Tropikalnych i Hepatologii

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: Prof. dr hab. med. Alicja Wiercińska-Drapała

Wojewódzki Szpital Zakaźny, ul. Wolska 37 01-201 Warszawa
Tel: 022-5533222 faks: 022-6310535 e-mail: awiercinska@gmail.com

Warszawa, 6. 12. 2022

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Mulugety Wondim

**pt. „Detection an Molecular characterization of Babesia spp. And Tick-Borne
Encephalitis Virus in Tick from Poland and Ethiopia”**

– rozprawa przedstawiona w języku angielskim

Choroby przenoszone przez kleszcze stanowią jeden z głównych problemów epidemiologicznych i klinicznych na świecie. Istnieje wiele patogenów przenoszonych przez kleszcze, które stanowią realne zagrożenie dla ludzi i zwierząt. Jednym z nich jest wirus kleszczowego zapalenia mózgu. Najpoważniejszą formą choroby wywoływaną przez ten wirus jest kleszczowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i rdzenia- (KZM) ang. *meningoencephalomyelitis*). Ryzyko rozwoju powikłań po KZM jest zróżnicowane w zależności od badanej populacji i może sięgać nawet 58%. Powikłania, głównie neurologiczne i psychiatryczne, wpływają znacząco na jakość życia. Babeszjoza to także niebezpieczna choroba odkleszczowa, w obrazie klinicznym zbliżona do malarii, która jest najczęstszą chorobą wektorową na świecie. Epidemiologia chorób przenoszonych przez kleszcze zmienia się pod wpływem czynników klimatycznych i społeczno-ekonomicznych. Zarażone kleszcze są obecne

nawet w parkach miejskich, co sprawia, że realne zagrożenie zachorowania na choroby odkleszczowe jest bardzo duże. Dane dotyczące obecności patogenów u kleszczy są skąpe, zarówno w Polsce, jak i w Etiopii, w której to możliwości diagnostyczne chorób odkleszczowych są niezadawalające.

Cele pracy doktorskiej pt. „Wykrywanie i charakterystyka molekularna *Babesia* spp. i wirusa kleszczowego zapalenia mózgu u kleszczy z Polski i Etiopii” są aktualne, a hipotezy rozprawy doktorskiej warte zbadania. Ponadto należy podkreślić, że projekt badawczy był realizowany w ramach unijnego programu badań naukowych i innowacji *Horyzont 2020* w ramach umowy o grant „*Maria Skłodowska-Curie*” nr 754432 oraz *Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego* ze środków finansowych na naukę w 2018-2023 przyznanych na realizację międzynarodowego projektu współfinansowanego. To wyjątkowa formuła współpracy pomiędzy ośrodkami naukowymi, a według mojej wiedzy dotychczas nie ma absolwentów tego typu studiów doktoranckich.

Celem pracy mgr Mulugety Wondim było:

- wykrycie i charakterystyka molekularna pierwotniaków *Babesia* spp. i wirusów kleszczowego zapalenia mózgu u kleszczy z Polski i Etiopii
- badanie rozpowszechnienia i zmienności szczepów *Babesia* spp. Polski i Etiopii
- analiza potencjalnych predyktorów takich jak temperatura, wilgotność, stadium rozwojowe i gatunek) wykrywania patogenów przenoszonych przez kleszcze u kleszczy pobranych z Polski i Etiopii.

Materiałem badanym były kleszcze zebrane z Knyszyńskiego Parku Krajobrazowego w północno-wschodniej Polsce, a także z wielu obszarów w Etiopii. Ekologia miejsc zbierania kleszczy zawierała wszystkie niezbędne elementy

schronienia dla kleszczy. DNA zostało wyekstrahowane z kleszczy zebranych zarówno w Polsce, jak i w Etiopii, podczas gdy RNA zostało wyekstrahowane z kleszczy zebranych tylko w Polsce. Warto wspomnieć, że Puszcza Knyszyńska położona jest w województwie podlaskim, będącym endemicznym obszarem chorób odkleszczowych w Polsce, Interesująca jest również analiza kleszczy z wielu miejsc w Etiopii.

Wykrywanie *Babesia* spp. a TBEV przeprowadzono stosując konwencjonalne metody PCR i jakościowe metody RT-PCR. Pozytywne próbki zsekwencjonowano. Ponadto przeprowadzono analizę pomiędzy między etapem rozwojowym kleszczy, temperaturą otoczenia podczas pobierania kleszczy, gatunkiem i płcią kleszczy, a częstością wykrywania wirusa KZM. Metody badawcze są nowoczesne i dobrze dobrane do zrealizowania założonych celów.

Doktorant zebrał i przebadął 995 (727 z Polski i 268 z Etiopii). U 85 kleszczy (51%) wykrył DNA *Babesia* spp, z których 61 zebrano w Polsce, a 24 w Etiopii. Odsetek zarażonych kleszczy tym pierwotniakiem w obu krajach był podobny, w Polsce 9,7% a w Etiopii 8,96%. U 1,17% kleszczy stwierdził infekcję *Babesia* spp i KZM. Spośród 626 kleszczy z Polski 61 (9,74%) i spośród 268 kleszczy z Etiopii 24 (8,96%) było dodatnich w kierunku *Babesia* spp. Siedem (1,17%) z 601 kleszczy miało koinfekcję *Babesia* spp. i wirusa kleszczowego zapalenia mózgu. DNA *Babesia* spp. doktorant wykrył u 9,59% kleszczy *Ixodes ricinus* i u 9,83% *Dermacentor reticulatus*.

Analiza sekwencjonowania patogenów *Babesia* spp. wykazała, że najczęstszym gatunkiem była *B. microti*, którą stwierdzono aż u 70,59% (60/85) próbek ze średnią homologią 87,56%. Oprócz *B. microti*, przy pomocy tej samej

metody sekwencjonowania u Doktorant wykrył inne pierwotniaki: u 8,24% (7/85) - *Theileria velifera*, u 4,71% (4/85) *B. capreoli*, u 3,53% (3/85) *B. venatorum* i *B. canis* a u 2,35% (2 /85) *Theileria mutans*.

Ważnym osiągnięciem Doktoranta jest wykazanie przy pomocy wieloczynnikowej regresji logistycznej mniejszego o 93,7% prawdopodobieństwa stwierdzenia wirusa KZM w kleszczach z rodzaju *Ixodes ricinus* w porównaniu z kleszczami *D. reticulatus* ($p = 0,007$). Kleszcze zebrane w temperaturze otoczenia 15-17°C miały o 95,8% mniejsze prawdopodobieństwo zakażenia TBEV w porównaniu z kleszczami zebranymi w temperaturze poniżej 15°C ($p < 0,001$). Jeśli chodzi o etap rozwojowy kleszczy dostosowany do gatunku i temperatury, dorosłe kleszcze (OR=23,66) były bardziej narażone na zakażenie TBEV ($p < 0,001$).

Dyskusja ma charakter logiczny i obejmuje najważniejsze zagadnienia poruszane w pracy doktorskiej. Literatura jest wystarczająco obszerna i aktualna. Osiągnięcia naukowe Pana Mulugety Wondim pokazują Jego dobre przygotowanie metodologiczno-merytoryczne, szczególnie umiejętność krytycznej dyskusji przedmiotowej. Bardzo ważnym elementem pracy jest wieloaspektowa analiza ograniczeń przeprowadzonych badań. Świadczy to o dojrzałości naukowej kandydata.

Na podstawie wyników badań Doktorant wyciągnął trzy trafnie sformułowane wnioski. Stwierdził, że *B. microti* jest najczęściej wykrywanym szczepem *Babesia spp.* we wschodniej i północno-wschodniej Polsce oraz Etiopii. Wszystkie TBEV były podtypem europejskim. Temperatura podczas pobierania kleszczy, gatunki kleszczy i ich stadia rozwojowe decydują o wykrywalności TBEV.

Praca jest dobrze zaplanowana i starannie wykonana na wysokim poziomie prowadzonych badań. Drobne usterki językowo-stylistyczne nie obniżają znacząco jakości pracy. Warto podkreślić, że praca doktorska powstała w wiodącym ośrodku naukowo-klinicznym w zakresie chorób odkleszczowych. Osiągnięcie takiego poziomu naukowo-badawczego świadczy o znakomitej współpracy Doktoranta z Jego promotorami, Prof. Anną Malinowską-Moniuszko i promotorem pomocniczym, dr hab. Justyną Dunaj-Małyszko, wybitnymi specjalistami w zakresie problematyki chorób odkleszczowych.

Mam kilka uwag do Doktoranta, które chciałabym przedyskutować na obronie:

1. Dlaczego nie przeprowadzono analizy potencjalnych predyktorów (temperatura, wilgotność, stadium rozwojowe i gatunek) mogących mieć wpływ na częstość występowania *Babesia spp.*?
2. Co sądzi Pan o uzyskanym w badaniach wyniku wskaźnika koinfekcji? Kwestia ta nie jest szczegółowo omawiana.
3. Jak można wyjaśnić wykrycie *Theileria velifera* w analizie sekwencji i jakie może to mieć implikacje dla epidemiologii?

Podsumowanie:

Praca doktorska mgr Mulugety Wondim wnosi istotny wkład w wiedzę na temat epidemiologii zagrożeń chorobami odkleszczowymi. Jest pracą oryginalną, przydatną naukowo i praktycznie. Przedstawiona mi do oceny praca stanowi samodzielny i oryginalny dorobek naukowy Kandydata. Praca mgr Mulugety Wondim spełnia warunki określone w artykule 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2022 poz. 574 z późn. zm.). Zwracam się z

uprzejmą prośbą do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Mulugety Wondim do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. med. Alicja Wiercińska-Drapała



Klinika Chorób Zakaźnych, Tropikalnych i Hepatologii

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: Prof. dr hab. med. Alicja Wiercińska-Drapała

Wojewódzki Szpital Zakaźny, ul. Wolska 37 01-201 Warszawa

Tel: 022-5533222 faks: 022-6310535 e-mail: awiercinska@gmail.com

Warszawa, December 6, 2022

Reader's Report

Doctoral Dissertation: *Detection and Molecular characterization of Babesia spp. And Tick-Borne Encephalitis Virus in Tick from Poland and Ethiopia*

Author, Mulugeta A. Wondim, M.A.

Tick-borne diseases are still among the most significant epidemiological and clinical problems worldwide. Ticks carry many pathogens, causing a real threat to humans and animals. One of them is tick-borne encephalitis virus – an aetiologic factor of tick-borne encephalitis. The disease may take three distinct courses, with meningoencephalomyelitis as its most dangerous form. Also, the risk of sequelae development after TBE varies depending on examined population and may be up to 58%. The complications, mostly neurological and psychiatric, influence the patient's quality of life. Babesiosis is also a dangerous tick-borne disease. Its clinical picture is similar to malaria, the most common vector-borne disease in the world. The epidemiology of tick-borne diseases is changing due to climatic and socio-economical factors. Infected ticks are even present in urban parks, which makes the

real threat more extensive. The diagnostics level in Ethiopia needs further development, as the data regarding the pathogen's presence in ticks is scarce.

The aims of the dissertation "Detection and Molecular characterization of *Babesia* spp. and Tick-Borne Encephalitis Virus in ticks from Poland and Ethiopia" are timely, and the hypotheses of the Ph.D. thesis are worth investigating. It is imperative to highlight that the doctoral project was performed in the frame of the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 754432 and the Polish Ministry of Science and Higher Education from financial resources for science in 2018-2023 granted for the implementation of an international co-financed project. It is a unique formula, and as far as I know, there are only a few graduates of this kind of Ph.D. pathway.

This study aimed to detect and molecularly characterize *Babesia* spp. and tick-borne encephalitis virus in ticks from Poland and Ethiopia. It investigated the prevalence and strain variation between *Babesia* spp. of Poland and Ethiopia. Further, it examined the potential predictors (temperature, humidity, developmental stage, and species) of tick-borne pathogens detection in ticks collected from Poland and Ethiopia.

The ticks were collected from Knyszyn Forest Landscape Park in North-East Poland and multiple sites in Ethiopia. The ecology of tick collection sites had the complete essentials for ticks' shelter. DNA was extracted from ticks collected in Poland and Ethiopia, while RNA was extracted from ticks collected in Poland only. It is considerable to notice that Knyszyn Forest, located in the Podlaskie region, is an endemic area for tick-borne diseases in Poland with the highest

incidence of tick-borne diseases in the whole country. Also, the analysis of ticks from many places in Ethiopia is remarkable.

Babesia spp. and TBEV were detected using conventional PCR and qualitative RT-PCR methods. The methods are modern and adequate to the aims of the research. Positive samples were sequenced. Additionally, an association between the developmental stage of ticks, ambient temperature during tick collection, species and sex of ticks, and TBEV detection rate was performed.

A total of 995 (727 from Poland and 268 from Ethiopia) ticks were collected and examined to detect whether ticks were infected with TBEV and/or *Babesia* spp.. Eighty-five (9.51%) ticks out of 894 were positive for *Babesia* spp. Among the 626 ticks from Poland, 61 (9.74%) and out of the 268 ticks from Ethiopia, 24 (8.96%) were positive for *Babesia* spp. Seven (1.17%) out of the 601 ticks had co-infection of *Babesia* spp. and TBEV, while 86 (14.31%) ticks had monoinfection.

The overall prevalence of *Babesia* spp. in both tick species was 9.51%, with 9.59% in *I. ricinus* and *D. reticulatus* 9.83%. Sequencing analysis of *Babesia* spp. showed *B. microti* in 70.59% (60/85) samples with a mean homology of 87.56% that ranges between 82.29-100%. Apart from *B. microti*, *Theileria velifera* 8.24% (7/85), *B. capreoli* 4.71% (4/85), *B. venatorum* and *B. canis* each 3.53% (3/85), and *Theileria mutans* 2.35% (2/85) were also detected via sequencing.

A multivariable logistic regression has shown that *I. ricinus* was 93.7% less likely to have TBEV than *D. reticulatus* species of ticks ($p= 0.007$). Ticks collected during an ambient temperature of 15-17°C were 95.8% less likely to have been infected with TBEV compared to those collected under a temperature of less than 15°C ($p\leq 0.001$). As for the developmental stage of ticks adjusted for species and

temperature, adult ticks (OR=23.66) were more likely to have been infected with TBEV ($p \leq 0.001$).

The discussion is logical and covers all the most critical issues raised in this study. The literature is up-to-date. This shows the academic maturity of Mr. Mulugera Wondim and his ability to perform critical scientific discussions. A vital aspect of the dissertation is a careful analysis of the study's limitations.

Based on the study's results, Mr. Mulugeta Wondim concluded that the *B. microti* is the most frequently detected strain of *Babesia* spp. in Eastern and North-Eastern Poland and Ethiopia. All TBEV were the European subtype. The temperature during tick collection, species of ticks, and their developmental stages determine the detection rate of TBEV.

The dissertation is well-written. Some minor editorial mistakes do not diminish the high level of the conducted research and the presentation of the results. Achieving such high research and scientific levels by the Ph.D. candidate indicates his excellent cooperation with his supervisors, Prof. Anna Malinowska-Moniuszko and adjunct supervisor, Dr. Hab. Justyna Dunaj-Małyszko, who are outstanding experts in the field of tick-borne diseases.

During the defense, I would like to discuss with the Ph.D. candidate some issues:

1. Why was there no analysis of the potential predictors (temperature, humidity, developmental stage, and species) of *Babesia* spp. prevalence performed?

2. What is your opinion on the co-infection rate demonstrated in your study? This issue is not discussed in detail.
3. How can you explain the detection of *Theileria velifera* in sequence analysis, and what implications on epidemiology it may have?

Mr. Mulugeta Wondim's, M.A., demonstrated a superior level of independent academic research and successfully presented the results of his investigations in an effective and productive discussion with the international literature on the subject. His doctoral dissertation significantly contributes to the current knowledge of the epidemiology of tick-borne diseases. It is an original work with a high potential for scientific and practical application. The work of Mr. Mulugeta Wondim, M.A., meets the requirements set out in Article 187 of the Act of 20 July 2018 Law on Higher Education and Science (i.e., Journal of Laws of 2022, item 574, as amended). It is my great pleasure to recommend to the Senate of the University of the Medical University of Białystok the admission of Mr. Mulugeta Wondim, M.A., to further stages of the doctoral procedure.



Prof. dr hab. med. Alicja Wiercińska-Drapała