



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

Exploring host and pathogen biomarkers for leprosy

Tio Coma, M.

Citation

Tio Coma, M. (2021, October 28). *Exploring host and pathogen biomarkers for leprosy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3229676>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3229676>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting

Lepra is een multifactoriële chronische ziekte, veroorzaakt door *Mycobacterium leprae* of *Mycobacterium lepromatosis*, die de huid en zenuwen aantast. Meer dan 200.000 nieuwe patiënten worden gediagnostiseerd per jaar; transmissie vindt dus nog steeds plaats. De meest waarschijnlijke transmissie route is de respiratoire route van mens op mens; Echter, de manier waarop transmissie plaats vindt is nog steeds niet helemaal bekend. Vroege lepra diagnose is cruciaal om transmissie en handicaps geassocieerd met lepra te verminderen en vermijden, deze handicaps zijn ook vaak de oorzaak van stigma. Op dit moment is de diagnose gebaseerd op klinische symptomen, waarbij late of misdiagnose regelmatig voorkomt.

In deze thesis hebben we de studie van pathogeen transmissie gecombineerd met host transcriptomic en genomische biomarkers. Om *M. leprae* transmissie te onderzoeken is een One Health benadering toegepast, waarin menselijke, dierlijke en omgevingssamples zijn bestudeerd.

In **hoofdstuk 2** is *M. leprae* transmissie in multibacillaire lepra patiënten en hun huishoud contacten (HC) bestudeerd in Bangladesh. We observeerde dat *M. leprae* niet alleen aanwezig was in lepra patiënten, maar ook in asymptomatische individuen. Vooral in de neusholten was *M. leprae* DNA aanwezig in de asymptomatische HC (tot 18%) en in serum werd in 36.8% anti-phenolic glycolipid I (PGL-I) IgM gedetecteerd.

M. leprae whole genomes zijn verkregen gedurende de tijd en een aan de hand daarvan is een genotype classificatie bepaald, bestaande uit 4 genotypes (1-4) en 16 subtypes (A-P). In **hoofdstuk 2** is de diversiteit van het *M. leprae* genoom in Bangladesh onderzocht en meerdere subtypes van genotype 1 (1A, 1C and 1D) werden geïdentificeerd, waarbij subtype 1D het meest prevalent was. Van belang is de beschrijving van een nieuw subtype, 1B-Bangladesh, dat tot nu toe alleen nog maar in Bangladesh werd gevonden. Bovendien hebben we laten zien dat subtype 1C geen afzonderlijk subtype vormt maar onderdeel is van genotype 1D.

In **hoofdstuk 3** hebben we onderzocht of aarde een potentieel reservoir voor de lepra bacterie kan zijn. We identificeerde *M. leprae* DNA in de aarde van huizen van lepra patiënten in Bangladesh en van armadillo holen in voormalige lepra koloniën in Suriname. Daarnaast werd *M. lepromatosis* gedetecteerd in aarde verkregen rond een gebied waar *M. lepromatosis* geïnfecteerde eekhoorns voorkomen in the Isle of Arran. Desalniettemin, de lage concentratie *M. leprae* of *M. lepromatosis* DNA die werd gevonden in aarde suggereert dat milieu contaminatie als een bron van infectie niet heel waarschijnlijk is.

Lepra komt niet exclusief voor in mensen, aangezien rode eekhoorns, armadillos and niet-humane primaten ook natuurlijk geïnfecteerd kunnen raken met *M. leprae* or *M. lepromatosis*. Eekhoorns geïnfecteerd met *M. leprae* or *M. lepromatosis* zijn geïdentificeerd

op de Britse eilanden. In **hoofdstuk 4** hebben we onderzocht of Nederlandse en Belgische eekhoorns dragers waren van de lepra bacterie. We onderzochten 114 eekhoorns met quantitative PCR (qPCR) en detecteerden in geen enkel dier *M. leprae* or *M. lepromatosis* DNA. Dit is in de lijn der verwachting met eerdere bevindingen in Frankrijk, Duitsland, Zwitserland en Italië, waar PCR ook niet de aanwezigheid van de lepra bacterie liet zien. Dus, tot nu toe, zijn eekhoorns geïnfecteerd met *M. leprae* or *M. lepromatosis* alleen nog maar geïdentificeerd op de Britse eilanden. Transmissie van de lepra bacterie van rode eekhoorns op mensen is nog niet beschreven en vanwege gelimiteerde interactie tussen de mens en de eekhoorn in de gebieden waar eekhoorns met lepra zijn gevonden en de geografische limitatie van de eilanden, is er geen reden tot grote zorg voor zoönose en transmissie naar andere gebieden. Desalniettemin blijft het noodzakelijk om waakzaam te blijven en om de studie naar dierlijke en omgevingsreservoirs te includeren in strategieën om de transmissie effectief te stoppen.

Vervolgens zochten we naar transcriptomic host biomarkers die lepra of lepra reacties zouden kunnen voorspellen voordat de symptomen verschijnen. In **hoofdstuk 5** hadden we als doel om een voorspellend transcriptomic signature in bloed te ontwikkelen dat zou kunnen aangeven of een individu, die intensief werd blootgesteld aan *M. leprae*, lepra zou gaan ontwikkelen. Gen expressie verschillen tussen lepra progressors en HC die geen symptomen ontwikkelden werden bestudeerd, gebruik makend van RNA-Seq. Minimale longitudinale intra-individuele variatie werd gevonden in gen expressie van lepra progressors tussen de pre-symptomatische fase en het tijdstip van klinische diagnose. Dit geeft aan dat gen expressie verschillen tussen gezonde individuen en degene die lepra gaan ontwikkelen al geobserveerd kunnen worden maanden voordat de klinische symptomen zichtbaar zijn. Een 4-genen transcriptomic signature, RISK4LEP genoemd, werd geïdentificeerd en gevalideerd in Bangladesh. Dit RNA signature kon HC (van lepra patiënten) die lepra ontwikkelden identificeren voordat de symptomen zichtbaar waren, 4 tot 61 maanden voor de klinische diagnose. Een machine learning algoritme, random forest, werd gebruikt om het signature te identificeren dat vervolgens werd gevalideerd met reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR). RISK4LEP bestaat uit de expressie van 4 genen: *MT-ND2*, *REX1BD*, *TPGS1* and *UBC*.

Lepra reacties zijn episodes van verhoogde inflammatie die onvoorspelbaar voorkomen voor, tijdens of na multi-drug treatment (MDT). Reacties worden vaak te laat of fout gediagnosticeerd, wat zou kunnen resulteren in permanente neuropathie of handicaps veroorzaakt door zweren en andere terugkerende pathologie. In **hoofdstuk 6**, hebben we dual color Reverse-Transcription Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (dcRT-MLPA) toegepast om een 5-genen signature te identificeren dat lepra reversal reactions (RR) kon voorspellen ≥ 2 maanden voor de start in lepra patiënten uit vier en-

demische gebieden: Bangladesh, Brazil, Ethiopia and Nepal. Het 5-genen RR signature wordt gevormd door *CCL2*, *CD8A*, *IL2*, *IL15* en *MARCO*. Het toepassen van ons 5-genen RR signature in een POC test zou kunnen leiden tot een reductie van reactie-geassocieerde neuropathie.

Tenslotte hebben we in **hoofdstuk 7** genomische biomarkers onderzocht om individuen te kunnen identificeren die een hoger risico hebben om lepra te ontwikkelen. Drie genetische markers (rs1801224, rs13001714 and rs1801582) waren geassocieerd met lepra in een familie studie analyse in Bangladesh. De associatie van deze markers met lepra was eerder beschreven in de Prata Village. Hoewel de resultaten niet gerepliceerd werden in een control-case set uit dezelfde regio in Bangladesh, zijn onze resultaten wel een validatie van de associatie van deze SNPs met lepra in een andere populatie. De beschreven genetische markers zijn gelokaliseerd in de genen *CUBN*, *IL1RL1* en *PRKN* (voormalig bekend als *PARK2*). Genetische varianten geassocieerd met susceptibiliteit voor lepra kunnen worden geïncorporeerd in een genetisch profiel om individuen te identificeren die een hoger risico hebben om lepra te ontwikkelen na blootstelling aan *M. leprae*.

De combinatie van demografische kenmerken, genetische en/of transcriptomic biomarkers, en pathogeen detectie kan worden gebruikt in een multifactorieel lepra signature toepasbaar voor vroege diagnostiek van lepra en/of om interventie strategieën te begeleiden. Identificatie van voorspellende biomarkers zal te zijner tijd leiden tot een snellere behandeling, waarbij lepra-geassocieerde handicaps kunnen worden voorkomen en ook de transmissie van *M. leprae* kan worden verminderd.