



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Development of immunodiagnostic tests for leprosy: from biomarker discovery to application in endemic areas

Hooij, A. van

Citation

Hooij, A. van. (2021, November 17). *Development of immunodiagnostic tests for leprosy: from biomarker discovery to application in endemic areas*.

Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3240171>

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/1887/3240171>

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

Nederlandse samenvatting

Lepra is een infectieziekte die de perifere zenuwen aantast en kan leiden tot ernstige blijvende of irreversibele handicaps. De ziekte beïnvloedt de sociaaleconomische status van individuen, onder andere door het stigma rondom lepra. De beschikbaarheid van een effectieve remedie sinds de jaren tachtig gaf hoop voor de eliminatie van lepra. Deze multi-drug therapie (MDT), bestaande uit een combinatie van drie antibiotica, wordt in landen waar lepra voorkomt gratis aangeboden sinds ruim 20 jaar aan patiënten door de Wereldgezondheidsorganisatie, waardoor grootschalige toepassing mogelijk is. Als gevolg daarvan daalde de prevalentie van lepra enorm. Sinds 2010 wordt echter een redelijk stabiel aantal nieuwe lepragevallen van ongeveer 200.000 per jaar gerapporteerd. Dit toont aan dat het verstrekken van MDT alleen, niet voldoende is om lepra te elimineren.

Het stabiele aantal nieuwe gevallen geeft aan dat de transmissie van *Mycobacterium leprae* en *Mycobacterium lepromatosis*, de mycobacteriën die lepra veroorzaken, nog steeds plaats vindt. Nog niet alles is bekend over de overdracht van deze mycobacteriën, maar onbehandelde patiënten worden als een belangrijke besmettingsbron beschouwd. Tijdige diagnose van deze patiënten is daarom van vitaal belang, zodat het tijdsbestek waarin een persoon besmettelijk is wordt verkort. Bovendien kan behandeling in een vroeg stadium van lepra onomkeerbare zenuwbeschadiging en lepra-geassocieerde handicaps voorkomen. Hulpmiddelen die de diagnose lepra bevestigen en/of *M. leprae* geïnfecteerde personen in een preklinisch stadium identificeren kunnen, vooral indien deze goedkoop en makkelijk te gebruiken zijn, een bijdrage leveren aan het (tijdig) starten van een therapeutische of profylactische behandeling. Echter zijn deze nog niet beschikbaar. Dit proefschrift richt zich daarom op de ontwikkeling van gebruiksvriendelijke diagnostische testen voor lepra.

De hoofdstukken 2-4 richten zich op het identificeren van biomarkers en de ontwikkeling van diagnostische testen om de detectie van leprapatiënten te verbeteren. De klinische symptomen van lepra hebben een spectraal karakter en worden beïnvloed door de immuunrespons van de gastheer. Multibacillaire (MB) patiënten induceren voornamelijk een antilichaam-gemedieerde respons (humoraal), terwijl paucibacillaire (PB) patiënten een T-helper 1-gemedieerde immuunrespons (cellulair) induceren, waardoor de bacteriële groei beter kan worden beperkt. De diversiteit aan immuun responsen binnen het lepra spectrum vereist de detectie van zowel cellulaire als humorale biomarkers in een diagnostische test. Om biomarkers te identificeren zijn zowel ELISAs als multiplex-bead-assays uitgevoerd voor 71 verschillende cytokines, chemokines en groeifactoren (hoofdstuk 2-3). Acht biomarkers (ApoA1, CCL4, CRP, IL-1Ra, IL-10, IP-10, αPGL-IgM,

S100A12) lieten in meerdere onafhankelijke cohorten uit Bangladesh een goed onderscheid zien tussen lepra patiënten en gezonde controles uit dezelfde regio.

De geïdentificeerde biomarkers zijn vervolgens geïmplementeerd in up-converting phosphor (UCP) lateral flow assays (LFA) (hoofdstuk 2-3). Deze kwantitatieve testen vereisen weinig apparatuur en kunnen resultaat geven binnen een uur. Dit maakt deze testen uitermate geschikt voor lepra endemische gebieden die vaak afgelegen zijn en beschikken over beperkte middelen. De LFAs waren net zo goed in staat om patiënten van gezonde controles te onderscheiden als de ELISA, met het voordeel dat de test point-of-care kan worden uitgevoerd. In hoofdstuk 4 is vervolgens een multi-biomarker test (MBT) strip ontwikkeld, waarbij tot zes verschillende biomarkers op een enkele strip tegelijk kunnen worden gemeten. Een biomarker signature bestaande uit ApoA1, CRP, IP-10, αPGL-I IgM en S100A12 geïmplementeerd op de MBT strip identificeerde zowel de MB als PB patiënten en biedt daarmee de mogelijkheid om met een enkele test patiënten aan beide kanten van het spectrum te identificeren. Daarnaast is de MBT strip ook te gebruiken met vingerprik bloed als biologisch sample, wat de point-of-care toepasbaarheid nog verder vergroot.

In de hoofdstukken 5-7 zijn de ontwikkelde UCP-LFAs verder geëvalueerd. In hoofdstuk 5 zijn twee verschillende testen die anti-PGL-I-antilichamen detecteren met elkaar vergeleken: de kwantitatieve αPGL-I IgM UCP-LFA geproduceerd in het LUMC en een kwalitatieve test waarbij NDO-LID als doelwitantigeen werd gebruikt (een conjugaat van zowel het PGL-I als het LID-1 antigeen). PGL-I is een glycolipid dat specifiek voorkomt in de celwand van *M. leprae*, antilichaam titers zijn daarom vooral hoog in MB patiënten. Beide testen zijn geëvalueerd in samples uit drie endemische lepragebieden (Bangladesh, Brazilië en de Filipijnen) en lieten inderdaad zien dat voornamelijk patiënten met een hoge bacteriële index goed geïdentificeerd konden worden, waarbij de αPGL-I IgM UCP-LFA de hoogste sensitiviteit liet zien.

In hoofdstuk 6 is de αPGL-I IgM UCP-LFA in combinatie met de LFAs voor IP-10, CRP en CCL4 verder geëvalueerd om te bepalen of deze biomarkers ook diagnostische waarde hadden voor lepra patiënten in Brazilië, China en Ethiopië. Ongeacht de mate van endemiciteit verbeterde de combinatie van meerdere LFAs de identificatie (sensitiviteit) van PB patiënten met 50% of meer. Dit laat zien dat de eerder geïdentificeerde biomarker signatures ook toepasbaar zijn in andere endemische gebieden dan Bangladesh.

De isolatie van *M. leprae* DNA uit nasal swabs en slit-skin smears van zowel lepra patiënten met een hoge bacteriële index en hun contacten gaf de mogelijkheid om de relatie tussen de geïdentificeerde biomarkers in hoofdstuk 2-3 en *M. leprae* kolonisatie (*M. leprae* DNA

aanwezig in nasale swabs), *M. leprae* infectie (*M. leprae* DNA aanwezig in slit-skin smears) en lepra diagnose in contacten te onderzoeken (hoofdstuk 7). De contacten van de MB patiënten hadden significant hogere ApoA1- en S100A12-niveaus dan endemische controles, vergelijkbaar met PB patiënten. Huishoudens waar *M. leprae* infectie en lepra niet voorkwamen werden gekenmerkt door hogere S100A12- en lagere CCL4-waarden. Behalve het aantonen van PB lepra, zijn de biomarkers geïdentificeerd in deze thesis dus ook nuttig voor de screening van contacten op *M. leprae* infectie.

Tot slot is in hoofdstuk 8 de toepasbaarheid van de anti-PGL-I IgM UCP-LFA voor diagnostiek bij rode eekhoorns onderzocht. Recent is ontdekt dat sommige rode eekhoorns op de Britse eilanden geïnfecteerd waren met *M. leprae* of *M. lepromatosis*, terwijl lepra al eeuwenlang niet meer voorkomt in dat gebied. Eekhoorns van deze populatie werden gevolgd in de tijd en gescreend op tekenen en symptomen van lepra en de aanwezigheid van *M. leprae* DNA. Eekhoorns met klinische symptomen vertoonden significant meer anti-PGL-I-antilichamen dan gezonde dieren of subklinisch geïnfecteerde dieren. De anti-PGL-I IgM UCP-LFA kan bijdragen aan de diagnose bij eekhoorns door deze serologisch te bevestigen en heeft dus potentie om ook bij andere potentiële dierlijke reservoirs, zoals armadillo's, *M. leprae* infectie op te sporen.

Concluderend, de implementatie van een diagnostische test als hulpmiddel in de huidige strategieën voor het elimineren van lepra zou de gamechanger kunnen zijn om de keten van stabiele *M. leprae*-transmissie te doorbreken. UCP-LFAs bieden de mogelijkheid om biomarker signatures te bepalen in omgevingen met weinig middelen, zowel in referentiecentra als point-of-care. Toepassingen van dit multifunctionele format variëren van aanvullende lepradiagnostiek tot populatiescreening op *M. leprae*-infectie. De in dit proefschrift ontwikkelde LFAs kunnen bijdragen aan een tijdige diagnose van patiënten en geven een nauwkeurig inzicht in de aanhoudende transmissie van *M. leprae*. Dit is essentieel om het aantal nieuwe lepragevallen te verminderen, lepra-geassocieerde handicaps te voorkomen en uiteindelijk wereldwijde eliminatie van lepra tot stand te brengen.

