

# **Nutrition and tuberculosis in Ethiopia: The role of vitamin D<sub>2</sub> derived from sun exposed oyster mushroom on the treatment outcomes of tuberculosis**

**Cumulative Dissertation for Obtaining the Doctoral Degree of  
Natural Sciences (Dr. rer. nat / Ph.D.)**

**Faculty of Natural Sciences**

**University of Hohenheim**

**Institute of Nutritional Sciences**

**Submitted by:**

**Tibebeselassie Seyoum Keflie**

**From Aleltu, Ethiopia**

**Stuttgart, 2019**

## CHAPTER 1.4. SUMMARY

---

### 1.4. Summary

Tuberculosis (TB) is an old infectious disease which causes ill-health among millions of people each year. Effective anti-TB drugs are available since 1950's, but still the global burden of TB remains enormous. The disease is very complex and there is a need to look for supportive treatment to the standard anti-TB drugs. Cognizant of this, the present doctoral study was undertaken by giving emphasis on nutrition and TB in Ethiopia. The aim of this doctoral dissertation thesis was to deal with the nutritional situation of people with and without TB and come-up with solutions that could support the effort of combatting TB. In this thesis, five papers (four published and one submitted) were included.

The first paper encompassed the study of dietary and nutritional assessment. In this study, dietary inadequacy, poor nutritional quality and high risk of micronutrient deficiencies were identified. The main dietary pattern included cereals, vegetables and legumes. About one-third of the population consumed animal source food (ASF). Malnutrition was the common problem in people with and without TB. This suggested that malnutrition may pave the way for TB.

The case-control study in the second paper revealed that more than one-half of TB patients had vitamin A and zinc deficiencies. More than three-fourth of TB patients had below half of the energy fulfilment. The protein intake was above the average fulfilment, but most TB patients relied on cereal-based diets. Patients with TB used a larger proportion of proteins from oral feeding for oxidation and hence for energy production. About half of the patients were undernourished. Thus, vitamin A and zinc deficiencies along with protein-energy malnutrition need to be addressed in the management programme of TB.

## CHAPTER 1.4. SUMMARY

---

The third paper included systematic review which explored the existence of vitamin D deficiency (VDD). Sunshine, which is very important for the synthesis of vitamin D under the skin, is widely available in Africa throughout the year. Surprisingly, more than three-fourth of TB patients in Africa had VDD and vitamin D insufficiency (VDI). Statistically significant variables such as use of sun protection (lack of sun-exposure), inadequate dietary intake, low body mass index (BMI), high skin pigmentation, use of drugs (anti-retroviral and /or anti-TB), low socioeconomic status, rainy season, covering body skin with clothes , old age and comorbidities were identified as the main predictor variables that hampered the status of vitamin D.

Vitamin D can be obtained from dietary intakes apart from endogenous synthesis after sun-exposure. Mushroom as such, is a potential non-animal source of vitamin D. The experimental study in the fourth paper revealed that sun-exposure significantly increased the content of vitamin D<sub>2</sub> in oyster mushroom. Increasing the surface area for sun-exposure enhanced the production of vitamin D<sub>2</sub>. Other factors such as duration of sun-exposure and moisture content determined the production of vitamin D<sub>2</sub>. Exposing slices of oyster mushroom to direct sun for brief period provided enough vitamin D<sub>2</sub> that could satisfy the current recommended dietary allowance (RDA) of vitamin D without any visible changes in colour and texture.

The study in the fifth paper was a randomized controlled trial and demonstrated for the first time the role of mushroom-derived vitamin D<sub>2</sub> on the treatment outcomes of TB. Intervention with vitamin D<sub>2</sub> derived from sun-exposed oyster mushrooms brought significant

## CHAPTER 1.4. SUMMARY

---

improvement in vitamin D status, clinical outcomes and immunological responses, but not in sputum smear and culture conversion. The intervention corrected VDD in more than one-third of TB patients. About one-third of the variability in TB score in the intervention group was accounted for by the change in the serum 25 hydroxy (OH) vitamin D level. There were also significant improvements in the serum IFN- $\gamma$  and cathelicidin LL-37 peptide levels after intervention. The balance of cytokines was skewed to TH<sub>1</sub> responses due to high level of IFN- $\gamma$ . Thus, mushroom-derived vitamin D<sub>2</sub> could serve as potential, safe, easily available and cost-effective adjunctive therapy for TB. Taken collectively, foods enriched with vitamin D need to be included in the national TB control programme to support the first line anti-TB drugs, increase the cure rate and reduce the infectiousness of TB.

## CHAPTER 1.5. ZUSAMMENFASSUNG

---

### 1.5. Zusammenfassung

Tuberkulose (TB) ist eine alte Infektionskrankheit, an der jedes Jahr Millionen von erkranken. Wirksame Medikamente gegen Tuberkulose sind seit den 1950er Jahren erhältlich, aber die enorme Bürde durch Tuberkulose ist weltweit immer noch groß. Die Krankheit ist sehr komplex und es besteht die Notwendigkeit, eine unterstützende Behandlung für die Standard-Anti-TB-Medikamente zu suchen. In Anbetracht dessen legte die vorliegende Doktorarbeit ihren Fokus auf die Ernährung von Tuberkulosepatienten in Äthiopien. Ziel dieser Dissertation war es, sich mit der Ernährungssituation von Menschen mit und ohne Tuberkulose zu befassen und Lösungen zu finden, die den Kampf gegen Tuberkulose unterstützen können. Die Ergebnisse dieser Arbeit resultierten in fünf Artikel (vier veröffentlicht und einer eingereicht).

Das erste Artikel befasste sich mit der Bewertung der Ernährung und des Ernährungsstatus. In dieser Studie wurden unzureichende Ernährung, eine schlechte Ernährungsqualität und ein hohes Risiko für Mikronährstoffmangel festgestellt. Das Hauptnahrungsmuster beinhaltete Getreide, Gemüse und Hülsenfrüchte. Etwa ein Drittel der Bevölkerung konsumierte tierische Nahrung (TN). Unterernährung war das häufigste Problem bei Menschen mit und ohne TB. Dies deutet darauf hin, dass Mangelernährung den Weg für TB ebnen könnte.

Die Fall-Kontroll-Studie in der zweiten Veröffentlichung ergab, dass mehr als die Hälfte der TB-Patienten einen Mangel an Vitamin A und Zink aufwies. Mehr als drei Viertel der TB-Patienten nahmen weniger als die Hälfte der empfohlenen Energie zu sich. Die Proteinaufnahme lag über dem Durchschnitt, aber die meisten TB-Patienten wiesen ein getreidebasiertes Ernährungsmuster auf. Patienten mit TB verwendeten einen größeren Anteil an Nahrungsprotein zur Oxidation und damit zur Energiegewinnung. Etwa die Hälfte der

## CHAPTER 1.5. ZUSAMMENFASSUNG

---

Patienten war unterernährt. Daher, müssen Vitamin A – und Zinkmängel zusammen mit Protein-Energie Mangelernährung im Behandlungsprogramm für TB angegangen werden.

Der dritte Artikel beinhaltete eine systematische Übersicht über die Prävalenz eines Vitamin-D-Mangel (VDD) bei TB-Patienten. Sonnenschein, der für die Synthese von Vitamin D in der Haut sehr wichtig ist, ist in Afrika das ganze Jahr verfügbar. Überraschenderweise hatten mehr als drei Viertel der TB-Patienten in Afrika eine VDD- und Vitamin-D-Insuffizienz (VDI). Statistisch signifikante Variablen wie Sonnenschutz (fehlende Sonnenexposition), unzureichende Nahrungsaufnahme, niedriger Body Mass Index (BMI), hohe Hautpigmentierung, Medikamenteneinnahme (antiretroviral und / oder anti-TB), geringer sozioökonomischer Status, Regenzeit, Bedeckung der Körperhaut durch Kleidung, Alter und Begleiterkrankungen wurden als Hauptprädiktorvariablen identifiziert, die den Status von Vitamin D beeinträchtigten.

Vitamin D kann neben der körpereigenen Synthese durch Sonnenexposition auch über die Nahrung aufgenommen werden. Pilz stellen eine potenzielle nicht-tierische Vitamin-D-Quelle dar. Die experimentelle Studie in der vierten Veröffentlichung ergab, dass die Sonnenexposition den Vitamin-D<sub>2</sub>-Gehalt in Austernpilzen signifikant erhöht. Eine Steigerung der bestrahlten Oberfläche erhöhte die Produktion von Vitamin D<sub>2</sub>. Andere Faktoren wie die Dauer der Sonneneinstrahlung und der Feuchtigkeitsgehalt beeinflussen die Produktion von Vitamin D<sub>2</sub> ebenfalls. Wenn Austernpilzscheiben für kurze Zeit direkter Sonneneinstrahlung ausgesetzt wurden, war der Vitamin D<sub>2</sub> – Gehalt ausreichend um die derzeit empfohlene Tagesdosis (RDA) für Vitamin D ohne sichtbare Änderungen der Farbe und Textur zu erreichen.

## CHAPTER 1.5. ZUSAMMENFASSUNG

---

Die Studie in der fünften Veröffentlichung war eine randomisierte kontrollierte Studie und zeigte zum ersten Mal die Rolle von aus Pilzen stammendem Vitamin D<sub>2</sub> für die Behandlungsergebnisse bei TB. Die Intervention mit Vitamin D<sub>2</sub> aus sonnenexponierten Austernpilzen führte zu einer signifikanten Verbesserung des Vitamin D-Status, der klinischen Ergebnisse und der immunologischen Reaktionen, jedoch nicht zu einer Verbesserung des Sputumabstrichs und der bakteriellen Kulturumwandlung. Die Intervention korrigierte VDD bei mehr als einem Drittel der TB-Patienten. Etwa ein Drittel der Variabilität des TB-Scores in der Interventionsgruppe war auf die Veränderung des Serum-25-Hydroxy (OH) -Vitamin-D-Spiegels zurückzuführen. Es gab auch signifikante Verbesserungen bei den Serum-IFN- $\gamma$  und Cathelicidin-LL-37-Peptidspiegeln nach der Intervention. Das Gleichgewicht der Zytokine wurde aufgrund des hohen IFN- $\gamma$ -Spiegels auf TH<sub>1</sub> – Antworten verzerrt. Somit könnte aus Pilzen gewonnenes Vitamin D<sub>2</sub> als potenzielle, sichere, leicht verfügbare und kostengünstige Zusatztherapie für TB dienen. Zusammengenommen müssen mit Vitamin D angereicherte Lebensmittel in das nationale TB-Bekämpfungsprogramm aufgenommen werden, um die ersten Medikamente gegen TB zu unterstützen, die Heilungsrate zu erhöhen und die Infektiosität von TB zu verringern.

## CHAPTER 1.2. CO-AUTHORS

---

### 1.2 Co-authors contribution

All the scientific works included in this doctoral dissertation thesis were designed, performed and published with the knowledge and approval of the main supervisor, **Prof. Dr. med. H. K. Biesalski**.

**Tibebeselassie Seyoum Keflie** undertook all the practical and analytical works. He conceived, designed and performed the experiments; collected, analysed and interpreted data; prepared the draft of the manuscript; and followed all aspects of the publication processes.

Co-authors from different institutes were partially involved in the scientific works of this thesis.

Prof. Dr. Donatus Nohr, Dr. Christine Lambert and Nils Nöle from University of Hohenheim; Dr. Markos Abebe and Dr. Adane Mihiret from Armauer Hansen Research Institute; Dr. Aregash Samuel from Ethiopian Public Health Institute; and Dr. Ashagrie Zewdu Woldegiorgis from Centre for Food Science and Nutrition, Addis Ababa University were critically reviewed and approved the manuscripts.



## CHAPTER 1.3. PUBLICATION LISTS

---

### 1.3. Publication lists

#### Peer-reviewed publications

1. **Tibebeselassie Seyoum Keflie**, Aregash Samuel, Christine Lambert, Donatus Nohr and Hans Konrad Biesalski. **2018**. Dietary Patterns and Risk of Micronutrient Deficiencies: their Implication for Nutritional Intervention in Ethiopia. *J Nutrition Health Food Sci* 6(1):1-16 DOI: 10.15226/jnhfs.2018.001120.
2. **Tibebeselassie Seyoum Keflie**, Aregash Samuel, Ashagrie Zewdu Woldegiorgis, Adane Mihret, Markos Abebe, Hans Konrad Biesalski. 2018. Vitamin A and zinc deficiencies among tuberculosis patients in Ethiopia. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis* 12 27–33.
3. **Tibebeselassie Seyoum Keflie**, Nils Nölle, Christine Lambert, Donatus Nohr, Hans Konrad Biesalski. 2015. Vitamin D deficiencies among tuberculosis patients in Africa: A systematic review. *Nutrition* 31: 1204–1212.
4. **Tibebeselassie Seyoum Keflie**, Nils Nölle, Christine Lambert, Donatus Nohr, Hans Konrad Biesalski. 2018. Impact of the natural resource of UVB on the content of vitamin D<sub>2</sub> in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) under subtropical settings. *Saudi Journal of Biological Sciences* <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.07.014>.
5. **Tibebeselassie Seyoum Keflie**, Aregash Samuel, Ashagrie Zewdu Woldegiorgis, Adane Mihret, Markos Abebe, Christine Lambert, Donatus Nohr, Hans Konrad Biesalski. Vitamin D<sub>2</sub> from sun-exposed Oyster Mushroom: Its impact on the treatment outcomes of tuberculosis. Submitted manuscript.

## Other publication

**Tibebeselassie Seyoum Keflie**, Gobena Ameni. 2014. Microscopic examination and smear negative pulmonary tuberculosis in Ethiopia. *Pan Africa Medical Journal*. Published.

## Oral presentations

1. **Tibebeselassie Seyoum Keflie**, Hans Konrad Biesalski. Vitamin D2 as Adjunctive Therapy of Tuberculosis. Nutrition 2019 annual conference. Baltimore, MD, USA. June 8 – 11, 2019.
2. **Tibebeselassie Keflie**, Hans Konrad Biesalski. Sun-exposed oyster mushrooms help patients fight tuberculosis. Selected by American Society of Nutrition on nutrition 2019 annual conference for media outreach and broadcasted in different news agencies including BBC. June 9, 2019.
3. **Tibebeselassie Seyoum Keflie**, Hans Konrad Biesalski. The role of vitamin D derived from sun-exposed oyster mushroom on the treatment outcomes of tuberculosis. Organized by Humboldt reloaded Interdisciplinary Summer school 2018 under the theme of ‘‘Is health nature or nurture. Bridging WHO and evidence-based research in alcoholism, depression and nutrition. September 20, 2018. University of Hohenheim, Germany.
4. **Tibebeselassie Seyoum Keflie**, Nils Nölle, Christine Lambert, Donatus Nohr, Hans Konrad Biesalski. Effects of sun-treatment on the quantities of vitamin D and minerals in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) cultivated in Ethiopia. Third international conference on food chemistry and technology (FCT-2017). November 2-4, 2017, Baltimore, MD, USA.

## CHAPTER 1.3. PUBLICATION LISTS

---

5. **Tibebeselassie Seyoum Keflie**, Hans Konrad Biesalski. Approaches of young scientists from food security centre, University of Hohenheim and Centre for Development Research (ZEF), University of Bonn. October 19, 2017. Stuttgart, Germany.
6. **Tibebeselassie Seyoum Keflie**, Hans Konrad Biesalski. Dietary patterns and nutritional status: their implication for nutritional intervention in North Shewa, Ethiopia. March 16, 2017. DAAD Alumni Food Security Networks Seminar. Session: Current research on food security issues. Stuttgart, Germany.
7. **Tibebeselassie Seyoum Keflie**, Nils Nölle, Christine Lambert, Donatus Nohr, Hans Konrad Biesalski. Vitamin D deficiencies among TB patients in Africa: A Systematic Review. National Nutrition Program (NNP) related research finding dissemination workshop. Theme: Evidence-Based Information to Support the Current and Future NNP. October 23-25, 2014. Executive Hotel – Adama, Ethiopia.

### Poster presentations

1. **Tibebeselassie Seyoum Keflie**, Christine Lambert, Donatus Nohr, Hans Konrad Biesalski. Vitamin D<sub>2</sub> from sun-treated oyster mushroom as an adjunctive therapy of tuberculosis. Fourth international congress of hidden hunger. February 27- March 1, 2019. Stuttgart, Germany.
2. **Tibebeselassie Seyoum Keflie**, Sarah Triller, Julian Philipp Wald, Christine Lambert, DonatusNohr, Hans Konrad Biesalski. Stinging nettle (*Urtica simensis*). An indigenous but unrecognized micronutrient potential for combatting hidden hunger in Ethiopia. September 20-22, 2017. University of Bonn, Germany.

## CHAPTER 1.3. PUBLICATION LISTS

---

3. **Tibebeselassie Seyoum Keflie**, Christine Lambert, Donatus Nohr, Hans Konrad Biesalski. Dietary patterns and nutritional status: Their implication for nutritional intervention in North Shewa, Ethiopia. 11<sup>th</sup> European Nutrition and Dietetics Conference. June 29-July 01, 2017 Madrid, Spain.
4. **Tibebeselassie Seyoum Keflie**, Nils Nölle, Christine Lambert, Donatus Nohr, Hans Konrad Biesalski. Effects of sun-treatment on the quantities of vitamin D and minerals in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) cultivated in Ethiopia. Third international congress hidden hunger. March 20-22, 2017. Stuttgart, Germany.
5. **Tibebeselassie Seyoum Keflie**, Hans Konrad Biesalski. Does sun-exposure have impact on the contents of vitamin D<sub>2</sub> and minerals in oyster mushroom? CLIFOOD conference organized by Food Security Centre of Hohenheim University. March 8, 2017. Stuttgart, Germany.