

Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
Abteilung der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Michael Hölscher

**Etablierung & Validierung
eines RNA-basierten molekularen Assays zur
Viabilitätstestung
von *Mycobacterium ulcerans***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dominik Müller, geb. Symank

aus
München

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

| | |
|---|---|
| Berichterstatterin: | Prof. Dr. med. Gisela Bretzel |
| Mitberichterstatter: | Prof. Dr. med. Frank Ebel PD Dr. med. Wolfgang Fischer |
| Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: | Dr. med. Marcus Beißner |
| Dekan: | Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 30.01.2020 |



Meinen Eltern

Teile der vorliegenden Dissertation wurden mit Genehmigung des Promotionsausschusses der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München bereits publiziert und bei Kongressen vorgestellt.

Originalarbeiten:

1. Beissner M*, **Symank D***, Phillips RO, Amoako YA, Awua-Boateng N-Y, et al. (2012) Detection of Viable *Mycobacterium ulcerans* in Clinical Samples by a Novel Combined 16S rRNA Reverse Transcriptase/IS2404 Real-Time qPCR Assay. PLoS Negl Trop Dis 6(8): e1756.

(*geteilte Erstautorenschaft)

2. Beissner M, Piten E, Maman I, **Symank D**, Jansson M, et al. (2012) Spontaneous Clearance of a Secondary Buruli Ulcer Lesion Emerging Ten Months after Completion of Chemotherapy - A Case Report from Togo. PLoS Negl Trop Dis 6(7): e1747.

Kongressbeiträge - Poster:

1. **Symank D**, Beissner M, Phillips R, Amoako Y, Awua-Boateng NY, Sarfo FS, Jansson M, Herbinger KH, Löscher T, Adjei O, Bretzel G. Detection of Viable *M. ulcerans* by Combined 16S rRNA Reverse-Transcriptase/IS2404 Quantitative Real-Time (q) PCR in Clinical Samples from Patients with Buruli Ulcer Disease. 102. Annual Meeting of the German Society for Tropical Medicine and International Health. Heidelberg, Germany, 2012. (*Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit, erster Platz*)
2. **Symank D**, Beissner M, Phillips R, Amoako Y, Awua-Boateng NY, Sarfo FS, Jansson M, Herbinger KH, Löscher T, Adjei O, Bretzel G. Detection of Viable *M. ulcerans* in Clinical Samples by Combined IS2404/16S rRNA Reverse-Transcriptase/Real-Time q PCR. 11. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin (KIT). Cologne, Germany, 2012.
3. Beissner M, Piten E, Maman I, **Symank D**, Jansson M, Nitschke J, Amekuse K, Kobara B, Wiedemann F, Hoffmann H, Diefenhardt A, Badziklou K, Banla Kere A, Löscher T, Bretzel G. Spontaneous Clearance of a Secondary Buruli Ulcer Lesion Emerging after Completion of Chemotherapy - a Case Report from Togo. 102. Annual Meeting of the German Society for Tropical Medicine and International Health. Heidelberg, Germany, 2012.
4. Beissner M, Piten E, Maman I, **Symank D**, Jansson M, Nitschke J, Amekuse K, Kobara B, Wiedemann F, Hoffmann H, Diefenhardt A, Badziklou K, Banla Kere A, Löscher T, Bretzel G. Spontaneous Clearance of a Secondary Buruli Ulcer Lesion Emerging Ten Months after Completion of Chemotherapy - a Case Report from Togo. 11. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin (KIT). Cologne, Germany, 2012.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Tabellenverzeichnis..... | 7 |
| Abbildungsverzeichnis..... | 9 |
| Abkürzungsverzeichnis..... | 10 |
| 1. Einleitung..... | 13 |
| 1.1. Überblick und Forschungsgeschichte..... | 13 |
| 1.2. Epidemiologie: Prävalenz und Transmission..... | 13 |
| 1.3. Klinisches Bild und Differenzialdiagnose..... | 16 |
| 1.4. Mikrobiologie..... | 18 |
| 1.5. Pathogenese..... | 19 |
| 1.6. Labordiagnostik..... | 20 |
| 1.7. Behandlung und Therapie des Buruli Ulkus..... | 22 |
| 1.8. Molekulare Methoden zur Therapiekontrolle bei Mykobakterien..... | 25 |
| 2. Problemstellung und Zielsetzung..... | 27 |
| 2.1. Problemstellung..... | 27 |
| 2.2. Zielsetzung..... | 27 |
| 3. Material und Methoden..... | 30 |
| 3.1. Definitionen..... | 30 |
| 3.2. Material..... | 31 |
| 3.2.1. Chemikalien..... | 31 |
| 3.2.2. Enzyme..... | 32 |
| 3.2.3. Nukleotide und Nukleinsäuren..... | 32 |
| 3.2.4. Reagenzien..... | 33 |
| 3.2.5. Geräte..... | 34 |
| 3.2.6. Weiteres Labormaterial..... | 35 |
| 3.2.7. Diagnostisches Probenmaterial..... | 35 |
| 3.2.8. Computerprogramme..... | 38 |
| 3.3. Methoden..... | 39 |
| 3.3.1. Ablauf..... | 39 |
| 3.3.2. Primer und Sonden..... | 39 |
| 3.3.3. Kombinierte RNA/DNA-Extraktion..... | 40 |
| 3.3.4. Real-Time qPCR..... | 40 |
| 3.3.5. Qualitätskontrolle..... | 42 |
| 3.3.5.1. Positivkontrollen..... | 42 |
| 3.3.5.2. Negativkontrollen..... | 42 |
| 3.3.5.3. Wipeout-Kontrollen..... | 43 |
| 3.3.6. Technische Validierung..... | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3.6.1. Sensitivität..... | 43 |
| 3.3.6.2. Spezifität..... | 44 |
| 3.3.6.3. Intra- und Inter-Assay-Variabilität..... | 45 |
| 3.3.7. Mykobakterielle Viabilität in Transportmedien..... | 45 |
| 3.3.8. Mykobakterielle Viabilität nach Hitzeinaktivierung..... | 46 |
| 3.3.9. Klinische Validierung..... | 46 |
| 3.3.9.1. Ethische Voraussetzungen..... | 47 |
| 3.3.9.2. Einschluss- und Ausschlusskriterien..... | 47 |
| 3.3.9.3. Probenentnahme..... | 47 |
| 3.3.9.4. Probenverarbeitung..... | 48 |
| 4. Ergebnisse..... | 49 |
| 4.1. Technische Validierung..... | 49 |
| 4.1.1. Sensitivität..... | 49 |
| 4.1.2. Spezifität..... | 51 |
| 4.1.3. Intra- und Inter-Assay-Variabilität..... | 51 |
| 4.2. Mykobakterielle Viabilität in Transportmedien..... | 52 |
| 4.3. Mykobakterielle Viabilität nach Hitzeinaktivierung..... | 52 |
| 4.4. Klinische Validierung..... | 52 |
| 4.5. Qualitätskontrolle..... | 54 |
| 5. Diskussion im Hinblick auf künftige Anwendungen..... | 55 |
| 6. Zusammenfassung..... | 59 |
| 7. Literaturverzeichnis..... | 61 |
| 8. Danksagungen..... | 71 |
| 9. Anhang..... | 72 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Tabelle 1: Beispiele für Differenzialdiagnosen des Buruli Ulkus..... | 18 |
| Tabelle 2: Chemikalien..... | 31 |
| Tabelle 3: Enzyme..... | 32 |
| Tabelle 4: Nukleotide und Nukleinsäuren..... | 32 |
| Tabelle 5: Reagenzien..... | 33 |
| Tabelle 6: Geräte..... | 34 |
| Tabelle 7: Weiteres Labormaterial..... | 35 |
| Tabelle 8: <i>M. ulcerans</i> Kulturen und Patientenproben..... | 35 |
| Tabelle 9: Bakterienstämme zur Spezifitätsprüfung des 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assays..... | 36 |
| Tabelle 10: Proben von Buruli Ulkus Patienten vor antibiotischer Therapie..... | 37 |
| Tabelle 11: Proben von DRB-PCR positiven Patienten nach achtwöchiger antibiotischer Therapie..... | 38 |
| Tabelle 12: Computerprogramme..... | 38 |
| Tabelle 13: Reaktionsmischung 16S-rRNA-qPCR zum Nachweis von <i>M. ulcerans</i> cDNA aus RNA..... | 41 |
| Tabelle 14: Reaktionsmischung IS2404-qPCR zum Nachweis von <i>M. ulcerans</i> DNA..... | 41 |
| Tabelle 15: Thermocycler Programmierung..... | 42 |

| | |
|--|-----------|
| Tabelle 16: Einschluss- und Ausschlusskriterien für die Buruli Ulkus Patienten vor Beginn der Therapie..... | 47 |
| Tabelle 17: Einschluss- und Ausschlusskriterien für die Buruli Ulkus Patienten nach Therapieabschluss..... | 47 |
| Tabelle 18: Ergebnisse der technischen Validierung..... | 50 |
| Tabelle 19: Intra- und Inter-Assay-Variabilität des 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assays..... | 51 |
| Tabelle 20: Ergebnisse der klinischen Proben der Patienten vor antibiotischer Behandlung..... | 53 |
| Tabelle 21: Ergebnisse der klinischen Proben der Patienten nach antibiotischer Behandlung..... | 54 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abbildung 1: Anzahl der 2018 weltweit registrierten Buruli Ulkus Fälle..... | 14 |
| Abbildung 2: Ein Nodulus am Unterarm eines Patienten..... | 17 |
| Abbildung 3: Ulzerierte Läsion..... | 17 |
| Abbildung 4: Narbige Verwachsungen nach antimykobakteriell therapierter <i>M. ulcerans</i> Infektion..... | 17 |
| Abbildung 5: Geplante Arbeitsschritte des kombinierten RNA/DNA-Extraktions-Assays.... | 28 |
| Abbildung 6: Standardkurve und LOD des IS2404-qPCR-Assays..... | 49 |
| Abbildung 7: Standardkurve des 16S-rRNA-Assays..... | 50 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|--|
| AIDS | erworbenes Immundefektsyndrom (engl.: acquired immune deficiency syndrome) |
| AITM | Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin, Klinikum der Universität München (LMU) |
| BBQ | BlackBerry Quencher |
| BCG | Bacillus Calmette-Guérin (frz.: Bacille Calmette-Guérin), attenuierter Lebendimpfstoff |
| bp | Basenpaar(e) |
| bzw. | beziehungsweise |
| BU | Buruli Ulkus |
| C. | Corynebakterium (lat.: <i>Corynebacterium</i>) |
| °C | Grad Celsius |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl.: complementary DNA) |
| CLS | Zellyse-Lösung (engl.: cell lysis solution) |
| cm | Zentimeter |
| Ct | Zyklusschwelle (engl.: cycle threshold) |
| CV | Variationskoeffizient (engl.: coefficient of variation) |
| d | Tag(e) (lat.: dies [diei]) |
| DEPC | Diethylpyrocarbonate |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid) |
| dNTPs | Desoxynukleosidtriphosphate |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| e.g. | zum Beispiel (lat.: exempli gratia) |
| FAM | Fluoresceinamidit |
| FIND | Foundation for Innovative New Diagnostics |
| FNA | Feinnadelaspirat(e) |
| gDNA | genomische Desoxyribonukleinsäure |
| h | Stunde(n) (lat.: hora[e]) |
| HIV | humanes Immunschwächevirus (engl.: human immunodeficiency virus) |
| HSV | <i>Herpes simplex</i> Virus |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| i.m. | intramuskulär |
| IPC | interne Positivkontrolle (engl.: internal positive control) |
| IS | Insertionssequenz |

| | |
|-----------|--|
| KCCR | Kumasi Center for Collaborative Research in Tropical Medicine, Kumasi, Ghana |
| kg | Kilogramm |
| KG | Körpergewicht |
| KNUST | Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi, Ghana |
| LMU | Ludwig-Maximilians-Universität München |
| LTM | flüssiges Transportmedium (engl.: liquid transport medium) |
| LOD | Nachweisgrenze (engl.: limit of detection) |
| LOG | Logarithmus |
| <i>M.</i> | Mykobakterium (lat.: <i>Mycobacterium</i>) |
| M | Molar |
| mg | Milligramm |
| min. | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| MPM | Mykolakton produzierende Mykobakterien (engl.: mycolactone producing mycobacteria) |
| mbp | Million(en) Basenpaare |
| MIQE | Minimale Information für die Veröffentlichung quantitative qPCR Experimente (engl.: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure (engl.: messenger ribonucleic acid) |
| MTBC | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Komplex (engl.: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex) |
| MU | <i>Mycobacterium ulcerans</i> |
| n | Anzahl (lat.: numerus) |
| NA | nicht verfügbar (engl.: not available) |
| NCBI | Nationales Zentrum für biotechnologische Information (engl.: National Center for Biotechnology Information) |
| NTD | vernachlässigte Tropenkrankheiten (engl.: neglected tropical diseases) |
| NTM | nichttuberkulöse Mykobakterien |
| OADC | Ölsäure Albumin Dextrose Katalase (engl.: oleic albumin dextrose catalase) |
| PANTA | Antibiotikamischung bestehend aus: Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim und Azlocillin |
| p.o. | über den Mund (lat.: per os) |

| | |
|------|---|
| qPCR | quantitative Polymerasekettenreaktion (engl.: quantitative real-time polymerase chain reaction) |
| RNA | Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid) |
| rRNA | ribosomale Ribonukleinsäure |
| RT | reverse Transkriptase/reverse Transkription |
| pH | Maß der Hydroniumionenkonzentration (lat.: potentia hydrogenii) |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction) |
| RLEP | <i>Mycobacterium leprae</i> -spezifische repetitive nicht kodierende DNA Sequenz |
| s | Sekunde(n) |
| s.o. | siehe oben |
| TBC | Tuberkulose |
| TBE | TRIS-Borat-EDTA-Puffer |
| TRIS | Trishydroxymethylaminomethan |
| µM | mikromolar |
| vs. | gegenüber (lat.: versus) |
| WHA | Weltgesundheitsversammlung (engl.: World Health Assembly) |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation (engl.: World Health Organisation) |

1. Einleitung

1.1. Überblick und Forschungsgeschichte

Sir Albert Cook, britischer Arzt und Missionar, beschrieb bereits 1897 in Britisch-Uganda erste Manifestationen eines Krankheitsbildes mit ausgedehnten kutanen Ulzerationen, welches nach heutigem Wissen der Klinik des Buruli Ulkus (BU) entspricht. Der Name der Krankheit stammt vom ehemaligen ugandischen Bezirk „Buruli County“ (heute: Nakasongola Distrikt), in welchem in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts viele klinisch diagnostizierte Fälle dokumentiert worden waren [1, 2]. Die ersten ausführlichen Fallberichte wurden erst ein halbes Jahrhundert später (1948), vom australischen Forscher Peter MacCallum vorgestellt, dessen Forschungsgruppe auch erstmals den Erreger des Buruli Ulkus, das *Mycobacterium ulcerans* (MU), isolierte [3, 4, 5].

Seit den 1980er Jahren treten Berichte über Buruli Ulkus Fälle gehäuft auf [6, 7]. 1998 wurde durch die WHO (Weltgesundheitsorganisation, engl.: World Health Organisation) die „Global Buruli Ulcer Initiative“ gegründet, mit dem Ziel, diese wenig bekannte Krankheit zu erforschen und adäquate diagnostische und therapeutische Strategien zu entwickeln [8]. Sechs Jahre später (2004) wurde von der WHA (Weltgesundheitsversammlung, engl.: World Health Assembly) eine Resolution verabschiedet, um die Überwachung der Erkrankung sowie die Entwicklung neuer Therapieoptionen zu ermöglichen und zu beschleunigen [8]. Im März 2009 wurde in Cotonou, Benin, die „Cotonou-Deklaration“ verfasst, in welcher ebenfalls verbesserte Überwachungsmaßnahmen und verstärkte Forschungsanstrengungen zur Bekämpfung der Erkrankung verabschiedet worden sind [9].

Das Buruli Ulkus zählt zu den vernachlässigten tropischen Erkrankungen (engl.: neglected tropical diseases, NTD) [10]. Die Krankheit kann zu langen Krankheitsverläufen und auch zu dauerhaften Behinderungen führen, was sowohl soziale als auch wirtschaftliche Auswirkungen mit sich bringen kann [11].

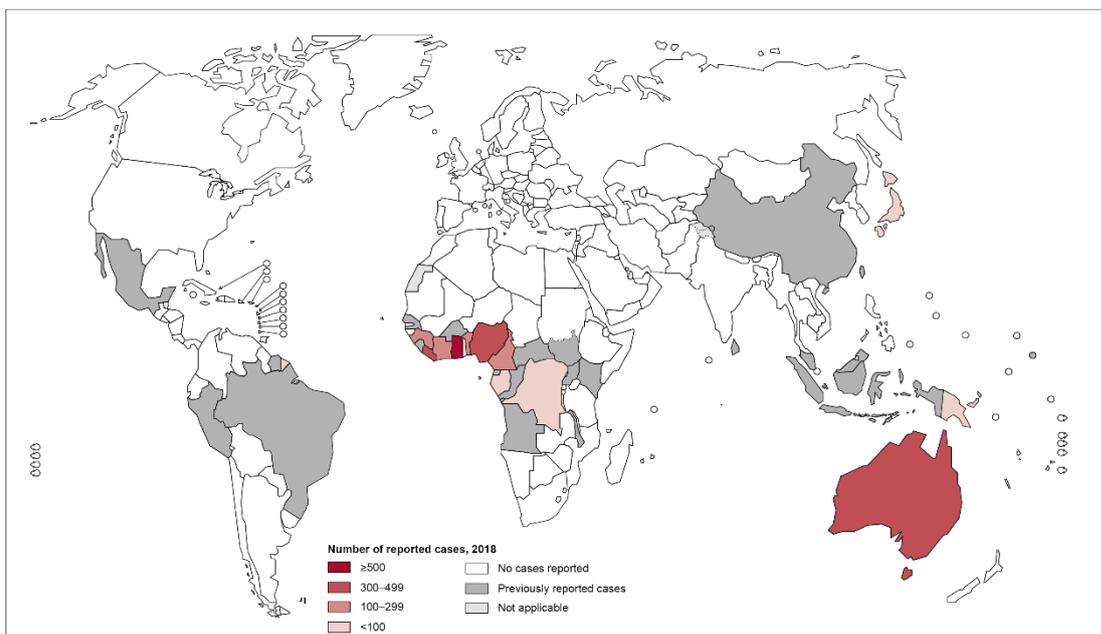
1.2. Epidemiologie: Prävalenz und Transmission

Nach der Tuberkulose und der Lepra ist das Buruli Ulkus weltweit die dritthäufigste mykobakterielle Erkrankung des immunkompetenten Menschen [7, 10, 12, 13]. Die der WHO gemeldeten Zahlen sind allerdings nicht mit labordiagnostisch bestätigten Fällen des Buruli Ulkus gleichzusetzen. Es ist häufig nicht nachvollziehbar, wie viele der gemeldeten Fälle

tatsächlich labordiagnostisch bestätigt und als Buruli Ulkus verifiziert worden sind. Zudem werden auch Fälle nicht gemeldet, da eine gesicherte Diagnose fehlt. Aufgrund fehlender flächendeckender Gesundheitsversorgung ist zusätzlich mit einer hohen Dunkelziffer in abgelegenen Gebieten endemischer Länder zu rechnen [14].

Das Buruli Ulkus wurde bis heute aus insgesamt 35 Ländern gemeldet, hauptsächlich aus Ländern mit tropischem und subtropischem Klima [14, 15]. Eine besondere Häufung der Erkrankung wird in Westafrika beobachtet: 2018 waren Ghana und Nigeria die Staaten mit den meisten gemeldeten, jedoch wie oben aufgeführt, nicht unbedingt labordiagnostisch gesicherten Fällen [6, 11]. Der WHO wurden im Jahr 2018 weltweit 2713 neue Buruli Ulkus Fälle gemeldet, davon 2335 aus Afrika; bei beiden Zahlen ist wiederum unklar, wie viele Fälle diagnostisch bestätigt worden sind [14]. Außerhalb von Afrika sind Buruli Ulkus Fälle in Papua-Neuguinea, Französisch-Guayana, Japan sowie in Australien aufgetreten [11, 14]. Nur vereinzelte Fälle wurden in der Vergangenheit aus anderen Ländern berichtet, vor allem aus China und Südamerika (vgl. Abb. 1.) [14, 16, 17].

Distribution of Buruli ulcer, worldwide, 2018



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2019. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Abbildung 1: Anzahl der 2018 weltweit registrierten Buruli Ulkus Fälle nach Staaten. Eine Häufung der Fälle gibt es vor allem in Westafrika. Ghana war 2018 der Staat mit den meisten (gemeldeten) Fällen.

(Quelle: WHO: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Buruli_2018.png)

Alle Altersgruppen sind vom Buruli Ulkus betroffen [8, 18, 19]. Über 50% der Patienten sind Kinder und Jugendliche im Alter bis 15 Jahren, wobei das mittlere Alter bei 12 Jahren liegt [8, 18, 20, 19, 21]. Bei immunkompromittierten Patienten, wie z. B. bei HIV-positiven Patienten im Stadium AIDS, ist die Inzidenz des Buruli Ulkus höher und der Krankheitsverlauf schwerer als bei immunkompetenten Patienten [22, 23, 24, 25, 26].

Charakteristisch für die Erkrankung ist ein fokales Auftreten innerhalb der endemischen Länder [27]. Im Zusammenhang mit Überschwemmungen, Migrationsbewegungen und der Errichtung von Staudämmen wurde über ein lokales Vorkommen des Buruli Ulkus berichtet [28, 29, 30, 31, 32]. Auch treten Erkrankungen in Afrika häufig in Nachbarschaft zu stehenden oder langsam fließenden Gewässern auf, weshalb angenommen wird, dass *M. ulcerans* hier eine biologische Nische in Feuchtbiotopen, wie z. B. Sümpfen oder Tümpeln besetzt [28, 29, 30, 32, 33, 34].

Der genaue Transmissionsweg von *M. ulcerans* ist bisher nicht endgültig geklärt [1, 35, 36, 37]. Der Nachweis einer Übertragung der Erkrankung auf den Menschen durch einen Vektor konnte bislang nicht erbracht werden [36, 38, 39]. Tiere könnten als Reservoir passiv zur Ausbreitung der Erkrankung beitragen [40]. *M. ulcerans* sowie *M. ulcerans*-DNA konnte in verschiedenen Tierspezies, deren Ausscheidungen, sowie in Wasserproben nachgewiesen werden [31, 32, 40]. In Australien zeigen Untersuchungen zufolge Beuteltiere (*Marsupialia*), wie z. B. der Koala (*Phascolarctos cinereus*), aber auch andere Vertreter dieser Unterklasse (*Pseudocheirus peregrinus*, *Trichosurus vulpecula* und *Trichosurus cunninghami*), eine hohe Durchseuchungsrate mit *M. ulcerans* [35, 41]. Die DNA des Bakteriums konnte außerdem aus Krebstieren (*Cambaroides japonicus*) und Schildkröten (*Lissemys punctata punctata*) isoliert und identifiziert werden, ebenso wie aus saugend-stechenden Mundwerkzeugen verschiedener Insekten [39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49].

Im Tierversuch konnte eine *M. ulcerans*-Infektion von Mäusen nach Bissen durch Schwimmwanzen der Gattung *Naucoridae* nachgewiesen werden [50]. Bei Laborversuchen mit Mäusen wurden auf mit *M. ulcerans* kontaminierter Haut Mückenstiche (*Aedes notoscriptus* und *Aedes aegypti*) provoziert und Nadelpunktionen durchgeführt [51]. Dabei entwickelten zwei von zwölf Mäusen mit Mückenstichen durch *Aedes notoscriptus* und 88% der mit Nadelstichen punktierten Mäuse ein Buruli Ulkus an der Inokulationsstelle [51].

Diese Nachweise von *M. ulcerans* legen nahe, dass die Infektion nicht über einen spezifischen Vektor erfolgt, sondern passiv aus der Umwelt über Hautkontaminationen durch Verletzungen von Epidermis und Kutis stattfinden könnte [34, 38, 40, 47, 52, 53, 54, 55]. Es

gibt keine Hinweise auf eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch. Die einzigen bekannten Fälle hierzu sind nach einem Menschenbiss und einer chirurgischen Kontamination beschrieben worden [54, 56, 57].

1.3. Klinisches Bild und Differenzialdiagnose

Das Buruli Ulkus ist eine Erkrankung, welche die Haut und das subkutane Fettgewebe, sowie seltener auch die Knochen betrifft [19, 23, 58, 59, 60]. Die grundsätzliche Unterscheidung der klinischen Manifestation besteht zwischen nichtulzerativen und ulzerativen Läsionen [19, 60].

Die klinische Beschreibung und Einteilung beruht auf der WHO-Klassifikation, welche auf Größe, Anzahl und Lokalisation der Läsionen basiert [61]. Es werden drei Kategorien unterschieden: Einzelne nichtulzerative Läsionen mit einem Durchmesser von <5 cm werden zu Kategorie I gezählt; wohingegen Kategorie II einzelne ulzerative oder nichtulzerative Läsionen mit einem Durchmesser zwischen 5 und 15 cm bezeichnet [19, 61]. Treten einzelne Läsionen mit einem Durchmesser >15 cm, multiple Läsionen, Läsionen in empfindlichen Bereichen (Genitalien, Gesicht) und/oder eine Osteitis/Osteomyelitis auf, so werden diese in Kategorie III klassifiziert [19, 61].

Im Primärstadium äußert sich das Buruli Ulkus häufig als verschiebbarer, schmerzloser Nodulus einer sub-/kutanen Schwellung (Abb. 2), als Papel oder Plaque, aber auch als alleinig auftretendes, diffuses, teils ausgedehntes Ödem [23, 59, 62]. Mit Fortschreiten der Erkrankung breiten sich die Läsionen häufig lokal aus und können sich zu Ulzera mit – den für Buruli Ulkus typischen – unterminierten Rändern entwickeln (Abb. 3) [23, 59, 62].

Die am häufigsten befallenen Körperregionen sind Arme, Beine und der Rumpf, wobei in selteneren Fällen auch andere Körperregionen, wie z.B. Gesicht oder Genitalien betroffen sein können [63]. Kompliziertere Fälle mit ossärem Befall in Form mykobakterieller Osteitiden/Osteomyelitiden sind ebenfalls beschrieben worden [64, 65, 66, 67]. Insbesondere wenn die Erkrankung zu spät diagnostiziert und behandelt wird, können ausgedehnte Ulzera zu ausgeprägter, narbiger Ausheilung und zu Kontrakturen von Haut, Bindegewebe und Muskulatur führen (Abb. 4) [59, 61, 68, 69]. Dies resultiert häufig in erheblichen funktionellen Beeinträchtigungen betroffener Gelenke [61, 68, 69]. Laut WHO wird die Gefahr, eine dauerhafte Behinderung zu erleiden, mit 25% beziffert [11].



Abbildung 2: Ein Nodulus am Unterarm eines Patienten - eine der primären Manifestationsformen des Buruli Ulkus (Quelle: Nana-Yaa Awua-Boateng, KCCR).



Abbildung 3: Ulzerierte Läsion mit typischen unterminierten Wundrändern (Quelle: Nana-Yaa Awua-Boateng, KCCR)



Abbildung 4: Narbige Verwachsungen nach antimykobakteriell therapierter *M. ulcerans* Infektion. Diese Patientin hat eine Spalthauttransplantation sowie eine rekonstruktive plastische Chirurgie erhalten [70] (Quelle: Nana-Yaa Awua-Boateng, KCCR).

Als Differenzialdiagnosen nichtulzerativer Formen des Buruli Ulkus kommen u. a. noduläre Läsionen bei Lymphadenopathien, wie etwa bei Tuberkulose in Betracht, aber auch Zysten und maligne Hauterkrankungen, wie z. B. Karzinome [6, 61]. Auch Hautläsionen bei Lepra (Leprome) können ein ähnliches Erscheinungsbild aufweisen [61]. Phlegmonen können wie durch *M. ulcerans* hervorgerufene Ödeme erscheinen [61].

Ulzerative Formen des Buruli Ulkus können mit kutaner Leishmaniose oder mit Erkrankungen, die durch Erreger wie *Treponema pertenue*, HSV oder andere Mykobakterien hervorgerufen werden, verwechselt werden [6, 71, 72]. Streptokokken und v.a. Staphylokokken können bei kleinen Hautverletzungen oder juckenden Insektenstichen ebenfalls zu Abszedierungen und Ulzerationen führen, und somit differenzialdiagnostisch relevant sein [71, 72].

Nichtinfektiöse Differenzialdiagnosen ulzerativer Formen des Buruli Ulkus sind chronische Beinulzera bei venöser oder arterieller Insuffizienz oder Diabetes mellitus sowie Neoplasien, Brandwunden und Abschürfwunden [6, 71, 72]. Tabelle 1 zeigt eine detaillierte Aufschlüsselung verschiedener Differenzialdiagnosen nach Manifestationsformen.

Tabelle 1: Beispiele für Differenzialdiagnosen des Buruli Ulkus, aufgeschlüsselt nach möglichen Manifestationsformen der Erkrankung (Quelle: <http://www.who.int/buruli/information/diagnosis/en/index3.html>)

| Papel | Nodulus | Plaques | Ödem | Ulkus |
|--------------------|---------------|-----------|--------------------------|------------------|
| Insektenstich | Zysten | Lepra | Phlegmone | Tropisches Ulkus |
| Akne | Lipom | Psoriasis | Elephantiasis | Ulcus cruris |
| Herpes | Onchozerkose | Mykose | Zellulitis | Leishmaniasis |
| Granuloma annulare | Malignom | | Nekrotisierende Faszitis | Abschürfungen |
| Frambösie | Lymphadenitis | | Osteomyelitis | Mykose |
| Pityriasis | | | | Basaliom |
| | | | | Haut-TBC |
| | | | | Lepra |
| | | | | Brandwunden |

1.4. Mikrobiologie

Zum Zwecke der Diagnostik und Behandlung werden humanpathogene *Mycobacteriaceae* in drei Hauptgruppen eingeteilt. Die erste Gruppe bezeichnet den *M. tuberculosis* Komplex (MTBC), zu welchem u.a. *M. tuberculosis* gehört. Mitglieder dieser Gruppe können Krankheitsbilder der Tuberkulose auslösen. Alleiniger Vertreter der zweiten Gruppe ist der

Erreger der Lepra, *M. leprae*. Alle übrigen humanpathogenen Mykobakterien werden als atypische, nichttuberkulöse Mykobakterien (NTM) bezeichnet und in der dritten Hauptgruppe zusammengefasst. Sie können u. a. tuberkuloseähnliche Lungenkrankheiten, Lymphadenitiden und Hautinfektionen erzeugen [62, 73]. *M. ulcerans* wird zur Gruppe III gezählt [6, 13, 62, 73].

M. ulcerans ist ein langsam wachsendes, grampositives, aerobes, nichtsporenbildendes, unbewegliches und säurefestes Stäbchenbakterium [73]. Die Generationszeit von *M. ulcerans* beträgt ca. 3,5 Tage [74]. Das Bakterium kann *in vitro* u. a. auf Löwenstein-Jensen-Medium bei einem Temperaturoptimum von 29-33°C kultiviert werden [62].

Phylogenetisch ist *M. ulcerans* eng mit dem *M. marinum*-Komplex verwandt [15, 75]. Unter diesem Begriff werden nicht Mykolakton-produzierende mykobakterielle Spezies (*M. marinum*) und Mykolakton-produzierende Spezies (*M. liflandii*, Strukturvariante E; einige abweichende Zweige von *M. marinum* und *M. pseudoshottsii*, Strukturvariante F), die für aquatische Vertebraten pathogen sind, zusammengefasst [15]. Die Genome dieser Spezies weisen eine Sequenzhomologie von bis zu 98% auf [75, 76]. Mykolakton ist ein mykobakterielles Exotoxin (siehe Abschnitt 1.5.).

Eine charakteristische Eigenschaft des *M. ulcerans* und der vier phylogenetisch eng verwandten Spezies (*M. pseudoshottsii*, *M. liflandii*, *M. shinsuense* und tierpathogener *M. marinum*-Stämme) ist eine hohe Kopienzahl der Insertionssequenz (IS) IS2404 [77, 78]. Humanpathogene *M. marinum*-Stämme, Erreger des Schwimmbadgranuloms (engl.: fish tank granuloma), weisen hingegen keine IS2404-Abschnitte auf [77, 78, 79].

Bei Insertionssequenzen (IS-Elementen) handelt es sich um kurze, flexible DNA-Abschnitte von Bakterien und Bakteriophagen mit sogenannten „inverted repeat“-Sequenzen, die sich spiegelbildlich wiederholen und in genomische DNA inseriert sind [79]. Das *M. ulcerans*-Genom enthält durchschnittlich 207 Kopien dieser Insertionssequenz [78].

1.5. Pathogenese

M. ulcerans gehört zusammen mit *M. pseudoshottsii*, *M. liflandii*, *M. shinsuense* und tierpathogenen *M. marinum*-Stämmen zu den Mykolakton-produzierenden Mykobakterien (MPM) [77, 80, 81]. Mykolakton ist ein mykobakterielles Exotoxin mit einer Makrolid-Struktur, [77] [81] dessen toxische Wirkung Auslöser der beim Buruli Ulkus vorkommenden, massiven Gewebedestruktion ist [80, 81, 82, 83]. Das Exotoxin hat eine lokale und systemische immunmodulatorische Wirkung, die unter anderem über eine Beeinflussung der

dendritischen Zellen wirkt [82, 84, 85, 86, 87]. Diese modulieren die Immunantwort, indem sie die Rekrutierung von Entzündungszellen, die Aktivierung von T-Lymphozyten und Makrophagen sowie die Produktion von Entzündungsmediatoren hemmen [82, 83, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92].

1.6. Labordiagnostik

Zur Entnahme von Probenmaterial aus nichtulzerativen Läsionen sowie Ulzera mit vernarbten Rändern eignen sich die Feinnadelaspiration (FNA), Stanzbiopsien und die chirurgische Entfernung des Gewebes [93, 94]. Stanzbiopsien werden nur noch bei dringendem klinischem Verdacht auf eine *M. ulcerans*-Infektion und gleichzeitigem negativen Untersuchungsergebnis aus FNA durchgeführt [93, 94].

Zur Labordiagnostik der ulzerativen Form des Buruli Ulkus können Wundabstriche, Stanzbiopsien und chirurgisch entferntes Gewebe als Probenmaterial verwendet werden [93, 94]. Wundabstriche sind hier das bevorzugte Standardverfahren [93, 94]. Chirurgisch entferntes Gewebe wird ausschließlich bei operativ behandelten Läsionen untersucht [93, 94].

Zur labordiagnostischen Untersuchung des Probenmaterials sind folgende Tests etabliert: die mikroskopische Untersuchung des Erregers, die Kultur, die histopathologische Untersuchung, die konventionelle PCR/Diagnostik sowie die quantitative Real-Time PCR (qPCR) mit einem Nachweis in Echtzeit („Real-Time“) [19, 62, 93, 94, 95, 96, 97, 15].

Zum mikroskopischen Nachweis säurefester Stäbchen können *M. ulcerans*-Bakterien mittels Ziehl-Neelsen-Färbung angefärbt werden [19, 62, 93, 94, 97, 98]. Als Untersuchungsmaterial eignen sich Wundabstriche und Proben aus FNA [19, 62, 93, 94, 97, 98]. Vorteile der mikroskopischen Untersuchung sind die schnelle und unkomplizierte Durchführung und ein sofortiges Ergebnis [19, 62, 93, 94, 97]. Nachteilig hingegen ist die relativ geringe Sensitivität von nur etwa 60% aufgrund einer variierenden Dichte der Mykobakterien auf dem Objektträger [19, 62]. Angesichts mangelnder Alternativen ist die mikroskopische Untersuchung in Endemiegebieten, trotz ihrer geringen Sensitivität, eine verbreitete Methode zur Diagnosesicherung [19, 62, 93, 94, 97, 98].

Wie bereits in 1.4. aufgeführt, kann *M. ulcerans* auf Löwenstein-Jensen-Medium bei 29-33°C kultiviert werden [19, 62, 93, 94, 97, 99]. Alle genannten Probenmaterialien (Wundabstrich, Stanzbiopsie, FNA und chirurgisch entferntes Gewebe) können prinzipiell zur Kultur verwendet werden [19, 62, 93, 94, 97, 99]. Nachteile der Kultivierung sind die geringe

Sensitivität von 20-60% sowie der hohe Zeitaufwand des Verfahrens [19, 62]. Ergebnisse stehen in der Regel erst nach mehreren Wochen zur Verfügung [19, 62]. Außerdem ist ein entsprechend ausgestattetes Labor (u. a. Brutschränke, Sicherheitswerkbänke) notwendig, um die Proben adäquat zu verarbeiten [19, 62, 93, 94, 97, 99]. Wenn viable Proben zeitnah kultiviert werden ist keine spezielle Lagerung notwendig, wenn dies nicht möglich ist, kann eine Lagerung bei -20°C erfolgen [59, 62, 93]. Es existieren zudem Pufferlösungen zum Transport viabler Mykobakterien, die mit DNA-Extraktionsmethoden kompatibel sind [59, 62]. Solche Pufferlösungen sind die flüssigen Transportmedien PANTA (Antibiotikamischung: Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim und Azlocillin) sowie LTM (engl. „liquid transport medium“) [6, 59]. Zur Herstellung und Zusammensetzung dieser Transportmedien siehe auch Tabelle 5 sowie Protokoll 2 im Anhang.

Die Histopathologie ist zur Untersuchung von chirurgisch entferntem Gewebe und von Stanzbiopsien einsetzbar [19, 62, 93, 94, 97]. Wenngleich dieses Verfahren eine Sensitivität von ca. 90% aufweist, birgt es dennoch Limitationen für den Einsatz in Endemiegebieten, da ein gut ausgestattetes Labor und ausgebildete Pathologen notwendig sind [19, 62, 93, 94, 97].

Als bevorzugtes Verfahren zur Diagnosesicherung gilt die konventionelle PCR [93, 15]. Ein positives PCR-Ergebnis wird als ausreichende Indikation betrachtet, um eine Therapie zu beginnen [93]. Um *M. ulcerans*-DNA nachzuweisen, muss diese zunächst aus den Proben gewonnen werden. Es existieren verschiedene Extraktionsmethoden für die Isolierung und Aufreinigung genomischer DNA aus klinischen Proben [19, 62, 93, 94, 97, 15]. Zur Detektion von *M. ulcerans*-DNA wurden unterschiedliche PCR-Protokolle entwickelt, basierend auf dem 16S-rRNA-Gen, dem hsp-65-Gen und der IS2404-Insertionssequenz, welche 1274 Basenpaare (bp) lang ist [62, 78, 94, 15, 100]. Es gibt verschiedene PCR-Protokolle, die unterschiedliche Abschnitte der IS2404-Insertionssequenz amplifizieren [62, 15].

Mit einer konventionellen PCR kann ein spezifischer Abschnitt (549 bp) der IS2404 vervielfältigt und in einer Gelelektrophorese nachgewiesen werden [62, 93, 15]. Für den Einsatz in tropischen Regionen ist eine Trockenreagenz-basierte (engl.: dry-reagent-based, DRB) PCR entwickelt worden, die eine 492 bp lange Sequenz der IS2404 amplifiziert [59, 15, 101, 102, 103].

Im Unterschied zur konventionellen PCR kann bei der qPCR auf eine Gelelektrophorese verzichtet werden, da die Detektion der Amplikons während des PCR-Laufs in Echtzeit erfolgt [15, 100]. Unter Verwendung einer Hybridisierungssonde wird ein kurzer Abschnitt (59 bp) der IS2404-Sequenz amplifiziert [62, 93, 95, 15, 100]. Durch einen Vergleich des

Antwortsignals bei der qPCR mit einer Standardkurve kann zudem eine (absolute) Quantifizierung der Bakterien erfolgen [15, 100]. Die Therapie kann bei bekannter Bakterienlast angepasst werden [100]. Bei hoher Bakterienzahl könnte eine längere Therapiedauer erwogen werden [104].

Als Material für die konventionelle PCR sowie die qPCR können Abstriche, FNA und Biopsiematerial verwendet werden [62, 15]. Vorteile der PCR-Verfahren sind die rasche Durchführbarkeit und Zuverlässigkeit [93, 94, 15]. So beträgt die Spezifität der konventionellen PCR 100% in klinischen Proben [62]. Allerdings kann keine Differenzierung zu anderen IS2404 exprimierenden Spezies getroffen werden (siehe Abschnitt 1.4.) [93]. Die Sensitivität der konventionellen PCR beträgt 99% für klinische Proben [62]. Der Nachweis mittels PCR erfordert jedoch speziell geschultes Personal, teure Gerätschaften und Reagenzien und gut ausgestattete Labore [59, 62, 93, 94, 97, 15, 101]. Auch erlaubt die PCR-Diagnostik keine Überwachung des Therapieerfolges da DNA, insbesondere kurze Fragmente der hoch-repetitiven IS2404-Sequenz eliminiertes Bakterien, lange im Gewebe persistieren können [105].

Empfehlungen der WHO zufolge sollen seit 2014 wenigstens 70% der Buruli Ulkus Fälle durch eine positive PCR-Diagnostik bestätigt werden [6, 59, 15]. Mit dem Ziel einer höheren Bestätigungs-Quote erfolgte die Gründung eines Netzwerkes kooperierender Referenzlabore auf der südlichen und nördlichen Hemisphäre, wodurch heute eine große Anzahl von Fällen in Endemiegebieten durch PCR bestätigt werden können [59, 15, 101].

1.7. Behandlung und Therapie des Buruli Ulkus

Bislang existiert keine Impfung gegen *M. ulcerans*-Infektionen. Die sekundäre Prävention besteht in der frühen Diagnose und Behandlung des Buruli Ulkus [12]. In früheren Studien wurde der Bacillus Calmette-Guérin-Impfung (BCG) ein gewisser protektiver Effekt für 6-12 Monate zugeschrieben [106, 107, 108]. In einer neuen Untersuchung, welche in Ghana, Togo und im Kongo durchgeführt wurde, konnte allerdings kein signifikanter protektiver Effekt der BCG-Impfung nachgewiesen werden. Da nicht bekannt ist, welche BCG-Erregerstämme bei den einzelnen Patienten zur Impfung verwendet worden sind, konnte jedoch keine endgültige Aussage zum präventiven Schutz der BCG-Impfung getroffen werden [109].

Bis 2004 wurde die Behandlung des Buruli Ulkus durch Wundpflege bzw. chirurgische Entfernung der ulzerativen Läsionen durchgeführt [58, 96]. Nach der Veröffentlichung von Studien zur Wirksamkeit einer kombinierten antimykobakteriellen Chemotherapie, wurde

diese zur Standardtherapie bei Buruli Ulkus [61, 62, 110, 111]. Seither empfiehlt die WHO die Erkrankung mit einer standardisierten, achtwöchigen Chemotherapie zu behandeln, welche aus den Tuberkulostatika Rifampicin (10 mg/kg KG/d p.o.) und Streptomycin (15 mg/kg KG/d i.m.) besteht [61, 62].

Als ausschließlich orale Therapie kommt auch Rifampicin (10 mg/kg KG/d p.o.) in Kombination mit Clarithromycin (7,5 mg/kg KG/d p.o.) zur Anwendung [112, 113, 114]. In verschiedenen Studien erwies sich diese Kombinationstherapie bei Patienten älter als 5 Jahre, die Läsionen mit einem Durchmesser <10 cm und nicht älter als 6 Monate aufwiesen, als ebenso wirksam wie die Standardtherapie mit Rifampicin und Streptomycin [112, 115]. Da Streptomycin nur als Injektionslösung zur Verfügung steht, kann ein Wechsel zu Clarithromycin, welches oral verabreicht wird, die Behandlung, Akzeptanz und Compliance verbessern. Wenngleich eine Behandlung mit Clarithromycin kostenintensiver ist als mit Streptomycin, ist Clarithromycin besser verträglich [6, 113]. Aminoglykosid-Antibiotika, wie das Streptomycin, weisen ein hohes Nebenwirkungsprofil auf, insbesondere Ototoxizität und Nephrotoxizität [113].

Monotherapien kommen prinzipiell wegen einer befürchteten Resistenzentwicklung von *M. ulcerans* wie bei anderen Mykobakteriosen nicht infrage [61, 116]. Seit Einführung der medikamentösen Therapie konnte die Rezidivrate des Buruli Ulkus, in einzelnen Studien, auf <2% gesenkt werden [59, 113]. Zu Zeiten rein chirurgischer Exzision betrug die Rezidivrate noch bis zu 30% [8, 59, 61, 113].

Trotz der antimykobakteriellen Behandlung kann eine chirurgische Revision notwendig werden [61]. Läsionen der Kategorie I und ein Teil der Kategorie II Läsionen heilen, unter medikamentöser Therapie und entsprechender Therapietreue der Patienten, in der Regel aus [61]. Bei Läsionen der Kategorie III ist jedoch meist eine chirurgische Behandlung indiziert [61]. Diese kann Debridement, Exzision, Hauttransplantation oder – wenn auch selten – Amputation betroffener Gliedmaßen umfassen [61, 94]. Unterstützende Maßnahmen, wie eine regelmäßige Wundpflege und – bei entsprechender Indikation – Physiotherapie zur Prophylaxe funktioneller Beeinträchtigungen, sollten ebenfalls erfolgen [61, 94].

Während einer Antibiotikabehandlung des Buruli Ulkus und nach deren Beendigung wurden paradoxe Reaktionen bei den Patienten beobachtet [59, 105, 113, 117, 118, 119]. Dabei kommt es zu einem scheinbaren Fortschreiten der Erkrankung, was sich in einer Größenprogression vorhandener Ulzera, der Ulzeration nichtulzerativer Läsionen, oder dem

Neuaufreten zuvor nicht klinisch diagnostizierter Läsionen manifestiert [105, 113, 117, 118, 119]. Es wurden sowohl frühe paradoxe Reaktionen beobachtet, die innerhalb weniger Tage bis Wochen nach Beginn der antibiotischen Behandlung auftraten, als auch späte paradoxe Reaktionen, die sich erst nach Beendigung der Behandlung zeigten [105, 117, 118, 119, 120].

Die Ätiologie dieser paradoxen Läsionen ist noch nicht umfassend geklärt [105, 117, 118, 119, 120]. Es wird angenommen, dass bei einer Reduktion der Erregerzahl die Immunsuppression durch Mykolakton regredient ist [105, 117, 118, 119, 120]. So könnte eine ausgeprägte Immunreaktion gegen Antigene persistierender, toter oder lebender Mykobakterien entstehen [105, 117, 118, 119]. Diese kann sich dann klinisch durch eine Persistenz oder ein Fortschreiten existierender Läsionen, oder ein Auftreten neuer Läsionen an sekundären, initial subklinischen Infektionsherden manifestieren [105, 117, 118, 119, 120].

In einer Studie aus Ghana wurde die Inzidenz paradoxer Reaktionen mit bis zu 78% (Ausdehnung vorhandener Läsionen), 83% (Ulzeration initial nichtulzerativer Läsionen) bzw. 6% (Neuaufreten zu Beginn der Therapie nicht evidenter Läsionen) innerhalb der ersten drei Monate nach Beginn der Behandlung beschrieben [117]. In einer australischen Studie traten bei 21% aller Patienten paradoxe Reaktionen auf [105]. Dabei handelte es sich in 55% der Fälle um eine Ausdehnung vorhandener Läsionen [105]. Bei 26% der betroffenen Patienten erschienen neue Läsionen im Abstand < 3 cm von bereits vorhandenen Läsionen, und in 19% der Fälle bildeten sich neue Läsionen, die über 3 cm von bereits bestehenden Läsionen entfernt waren [105]. 76% der Fälle traten zwischen Woche 3 und 13 der Antibiotikatherapie auf, 24% der Fälle nach Beendigung der Therapie [105]. Spät auftretende paradoxe Reaktionen, in Form neuer Läsionen, konnten bis zu 13 Monate nach Beendigung der antibiotischen Therapie beobachtet werden [118, 119].

Liegt eine paradoxe Reaktion vor, können DNA-basierte PCR-Tests weiterhin positiv ausfallen, da DNA nach dem Absterben der Mykobakterien in der Wunde persistieren kann [105, 117, 118, 119, 120]. Diagnostische Verfahren zum Nachweis viabler *M. ulcerans* in den Läsionen (z. B. Kultivierung) sind dagegen nach der Eradikation negativ [105, 117, 118, 119].

Bei Rezidiven bzw. Reinfektionen und Therapieversagen sind dagegen sowohl viable Mykobakterien in der Läsion nachweisbar als auch PCR-Tests zum Nachweis mykobakterieller DNA positiv [105, 117, 119]. Bei Therapieversagen verringert sich die Wirkung der antibiotischen Therapie, beispielsweise durch das Auftreten von

Antibiotikaresistenzen [121]. Unter einem Rezidiv versteht man ein Wiederauftreten einer Krankheit nach klinischer Heilung, z. B. durch Persistenz des Erregers [79].

Mit keiner der gegenwärtig gängigen diagnostischen Methoden kann hier eine rasche Differenzialdiagnose gewährleistet werden, da DNA-basierte PCR-Assays keinen Aufschluss darüber geben, ob sich in den Läsionen viable *M. ulcerans* befinden oder nur deren persistierende DNA [105]. Ein Nachweis mittels Kultivierung kann dagegen Wochen in Anspruch nehmen. Aufgrund dessen ist man bisher auf die klinische Beobachtung des Therapieerfolges angewiesen [8, 119].

Für die weiterführende Therapie ist es jedoch entscheidend, paradoxe Reaktionen von Therapieversagen und Rezidiven bzw. Reinfektionen zu unterscheiden [105, 119]. Tritt eine paradoxe Reaktion bei Antibiotikabehandlung auf, ist eine Änderung oder Verlängerung der Antibiotikatherapie nicht angezeigt, da angenommen wird, dass die Reaktion nicht von lebenden Mykobakterien ausgeht [118, 120]. In diesem Fall ist eine Ausheilung unter konservativer Therapie mit Wundpflege und Schonung der betroffenen Körperstelle möglich [118, 120]. Kommt es hingegen zum Therapieversagen, z. B. durch die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen, wird eine entsprechende Anpassung der Antibiotikatherapie notwendig [8, 105, 118, 119, 122, 123]. Bei langsam heilenden Läsionen („slow healers“) kann eine verlängerte antimykobakterielle Therapie notwendig sein („extended treatment“), um den vollständigen Heilungserfolg zu gewährleisten [112, 118, 123]. Im Falle von Rezidiven bzw. Reinfektionen ist eine erneute Therapie angezeigt [8, 105, 118, 119, 122, 123].

1.8. Molekulare Methoden zur Therapiekontrolle bei Mykobakteriosen

RNA-Assays, die auf dem Nachweis von Boten-RNA (engl.: messenger RNA, mRNA) oder ribosomaler RNA (rRNA) basieren, haben sich als adäquate Methode erwiesen, viable *M. tuberculosis* und *M. leprae* in klinischen Proben von Tuberkulose- bzw. Leprapatienten nachzuweisen [124, 125, 126, 127, 128, 129]. Während DNA in Wunden und Sputum der Patienten für lange Zeit persistieren kann, ist unkompartimentiert vorliegende RNA aufgrund ubiquitär vorhandener RNAsen – Enzyme, welche RNA abbauen – bereits kurz nach dem Zelltod nicht mehr nachweisbar [124, 125, 126]. Im RNA-basierten Viabilitätsassay kann, nach der Extraktion der Nukleinsäuren, der Nachweis mittels RT (reverse transcriptase)-PCR erfolgen [124, 126, 127, 129].

Zur Therapiekontrolle bei Tuberkulose-Infektion dient als Nachweis eine Konversion zu negativen Sputumkulturen [124, 125]. In einer 1999 veröffentlichten Studie wurde *M. tuberculosis* 85B (alpha antigen) mRNA in Sputumproben gemessen, wobei die Degradierung der mRNA als verlässlicher Indikator für ein Ansprechen der antimykobakteriellen Therapie befunden wurde [125, 126, 127].

Bei *M. leprae* ist eine kulturelle Anzuchtung *in vitro* bislang nicht gelungen [128, 129]. Daher gab es bisher lediglich die Möglichkeit, viable *M. leprae* in klinischen und experimentellen Proben, mittels Anzucht in Mäusen nachzuweisen [128, 129]. Als Abhilfe wurde ein 16S-rRNA/RLEP-RT-PCR-Viabilitätsassay entwickelt, der zuverlässig *M. leprae* in Biopsieproben vor Behandlungsbeginn nachweisen, sowie die Abnahme der Viabilität unter Therapie mit Rifampicin verifizieren kann [128, 129].

In der eigenen Arbeitsgruppe wurde ein optimierter 16S-rRNA-RT-PCR-Assay entwickelt, der es gestattet viable *M. leprae* aus nichtinvasiven Nasenschleimhautabstrichen nachzuweisen [Beissner M, Wöstemeier A et al, zur Publikation eingereicht, Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin, LMU München].

2. Problemstellung und Zielsetzung

2.1. Problemstellung

Die gegenwärtige Therapiekontrolle einer antibiotischen Therapie des Buruli Ulkus beruht überwiegend auf klinischer Beobachtung [8, 119]. Wie in Abschnitt 1.7. erläutert, kann keine der bisher vorhandenen diagnostischen Methoden für einen möglichst raschen Nachweis viabler Mykobakterien bei Patienten mit persistierenden Buruli Ulkus Läsionen bzw. sekundären Buruli Ulkus Läsionen herangezogen werden [8, 119].

Der Nachweis viabler *M. ulcerans* erfolgte bisher über den Versuch der Kultivierung von Mykobakterien aus klinischen Proben. Dieser dauert bei einer Inkubationszeit von mindestens 6-12 Wochen sehr lange und weist zudem nur eine geringe Sensitivität von 20-60% auf [62, 94, 97]. Da *M. ulcerans* DNA auch unter antimykobakterieller Behandlung lange im Wundbereich persistieren kann, ist eine Beurteilung der Abheilung allein auf Basis einer DNA-basierten PCR ebenfalls nicht sinnvoll [62, 97]. Folglich sind beide Methoden für eine zeitnahe Entscheidung zu einem therapeutischen Vorgehen nicht geeignet [62, 94, 97]. Der Nachweis viabler Mykobakterien würde eine klare Differenzierung zwischen Patienten mit paradoxen Reaktionen und Patienten, bei welchen Rezidiv, Reinfektion oder Therapieversagen der Grund für persistierende Läsionen ist, ermöglichen. Eine solche Differenzierung ist für die weitere Therapieentscheidung essenziell, da diese Patientengruppen jeweils ein anderes therapeutisches Management erfordern.

Eine RNA-basierte Nachweismethode für viable *M. ulcerans* nach dem Beispiel molekularbiologischer Assays für die mykobakteriellen Spezies *M. tuberculosis* und *M. leprae* fehlte bisher. Mit einem solchen Assay könnte eine adäquate Kontrolle des Therapieerfolges durchgeführt werden und mittels korrekter Differenzierung der oben genannten Patientengruppen die Therapie entsprechend angepasst werden. Zusätzlich würden zukünftige therapeutische Studien zur adäquaten Dauer der bisherigen Standardtherapie bei Buruli Ulkus sowie zu neuen Therapieregimen erleichtert werden.

2.2. Zielsetzung

Basierend auf den in 1.8. erwähnten, etablierten und veröffentlichten RNA-Assays für *M. tuberculosis* und *M. leprae*, sollte in dieser Arbeit eine 16S-rRNA reverse Transkriptase

Real-Time PCR (16S-RT-qPCR) entwickelt werden. Um eine Quantifizierung der Mykobakterien zu ermöglichen, sowie die Spezifität (Abgrenzung zu *M. marinum*) des Assays zu erhöhen, sollte die 16S-RT-qPCR mit einer quantitativen Real-Time IS2404-PCR (IS2404-qPCR) kombiniert werden. Die Quantifizierung sollte zeigen, ab welcher Keimlast (engl.: bacterial load) RNA nachweisbar ist. Die Keimlast ist die Quantität der Mykobakterien in einer Läsion. Bei einer kombinierten Extraktionsmethode sollten RNA und DNA aus derselben Probe extrahiert und bei einem simultanen PCR-Lauf die Zielsequenz beider Nucleinsäuren zeitgleich vervielfältigt werden (siehe Abbildung 5).

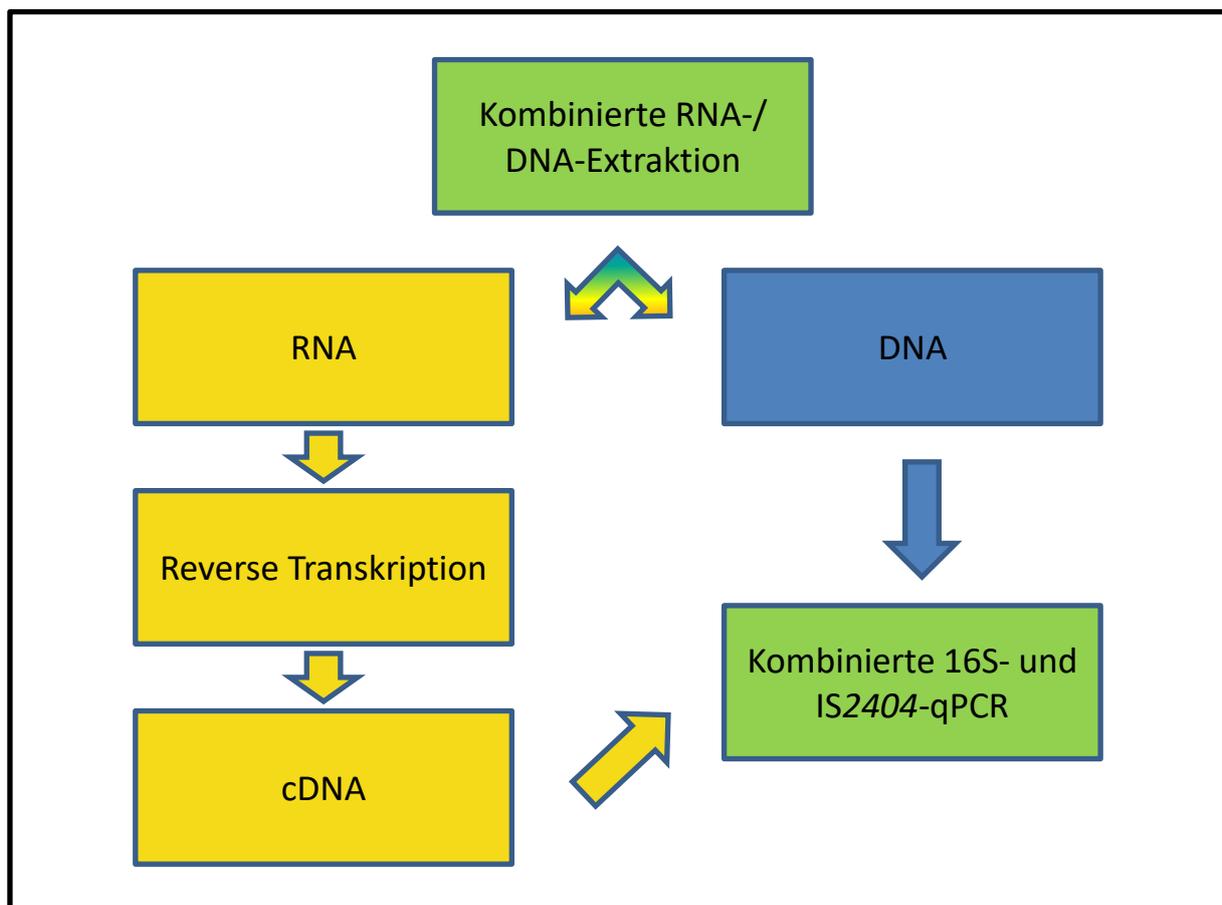


Abbildung 5: Geplante Arbeitsschritte des kombinierten RNA/DNA-Assays

Während bei der IS2404-qPCR mit einem bereits existierenden Assay gearbeitet werden konnte, bei dem lediglich die Detektionssonde aus thermodynamischen Gründen modifiziert werden musste, sollte die 16S-RT-qPCR neu entwickelt werden [62, 94, 100].

Die Entwicklung beinhaltete die Extraktion mykobakterieller Nucleinsäuren, DNA und RNA, aus kultivierten *M. ulcerans* und die reverse Transkription von RNA in cDNA (komplementäre DNA, engl.: complementary DNA). Es wurden Primer als Startpunkte der PCR, sowie Hybridisierungssonden zum Nachweis der Amplifikate entwickelt und getestet. Primer und

Sonden sollten durch Vergleich mit der Basenabfolge des *M. ulcerans*-Genoms in der Genbank (NCBI, nationales Zentrum für Biotechnologie Informationen, engl.: National Center for Biotechnology Information) entwickelt werden. Die Spezifität von Primern und Hybridisierungssonden sollte durch Vergleich mit der Basenabfolge der DNA potenzieller Kontaminationskeime und DNA verwandter Spezies untersucht werden. Darauf sollte die Etablierung einer speziellen qPCR zur simultanen Amplifikation aller extrahierten Nukleinsäuren mit den entwickelten Primern und Hybridisierungssonden erfolgen.

Mit der technischen Validierung des kombinierten 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assays sollte der formelle und dokumentierte Nachweis erbracht werden, dass die neue diagnostische Methode die an sie gestellten Anforderungen erfüllt und für ihren Einsatzzweck geeignet ist. Zur Untersuchung der Messeigenschaften der Methode mit Evaluation von analytischer Spezifität, Sensitivität sowie Intra- und Inter-Assay-Variabilität sollte somit die technische Validierung durchgeführt werden (Definitionen siehe 3.1.) [130]. Dies sollte mit standardisierten Proben geschehen, die aus kulturell angezüchteten Erregerstämmen gewonnen werden sollten.

Zur Kontrolle der Anwendbarkeit der entwickelten Methode im klinischen Bereich sollte anschließend eine Validierung mit Patientenproben aus einem Endemiegebiet des Buruli Ulkus in Ghana durchgeführt werden. Dabei sollte die diagnostische Sensitivität und Spezifität ermittelt werden (Definitionen siehe 3.1.) [130].

Um die Auswirkungen des Transportes der Proben in speziellen Transportmedien auf die Viabilität der Mykobakterien zu untersuchen, sollten mykobakterielle Transportmedien hergestellt werden. Mittels des neu entwickelten 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assays sollte die Überlebensfähigkeit der Mykobakterien in diesen Medien getestet werden.

3. Material und Methoden

3.1. Definitionen

Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität eines Analyseverfahrens gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit welcher ein erkrankter Patient tatsächlich als krank identifiziert werden kann. Sie wird als Quotient aller richtig-positiver Ergebnisse und der Summe aller richtig-positiver und falsch-negativer Testergebnisse definiert.

Die analytische Sensitivität entspricht der niedrigsten Erregerdichte, bei der ein Erreger nachweisbar ist [131].

Spezifität

Die diagnostische Spezifität eines Tests gibt Auskunft über den Prozentsatz nichterkrankter Patienten, die tatsächlich als gesund identifiziert werden. Sie wird als Quotient aller richtig-negativer Ergebnisse und der Summe aller richtig-negativer und falsch-positiver Ergebnisse definiert.

Die analytische Spezifität bezeichnet die korrekte Detektion der entsprechenden Zielsequenzen durch ein Verfahren (anstelle anderer, nichtspezifischer Zielsequenzen in einer Probe) [131].

Intra-Assay-Variabilität

Die Versuche zur Intra-Assay-Variabilität sollen zeigen, dass ein durchgeführter Schritt der Methode mit demselben Probenmaterial, zum selben Zeitpunkt, dieselben Ergebnisse liefert (Mehrfachansatz) [130].

Inter-Assay-Variabilität

Die Versuche zur Inter-Assay-Variabilität sollen zeigen, dass der Versuch zu unterschiedlichen Zeitpunkten dieselben Ergebnisse liefert [130].

Variationskoeffizient (engl.: coefficient of variation, CV)

Der CV wird als relative Standardabweichung der experimentell gemessenen Werte definiert und beschreibt die Intra- und Inter-Assay-Variabilität. Dies ist die Standardabweichung dividiert durch den Mittelwert. Die Standardabweichung ist definiert als Wurzel der Varianz des Mittelwertes [130].

Ct-Wert

(Engl.: cycle threshold, Ct), bezeichnet die Anzahl der Zyklen, die für ein Ansteigen der Signalkurve über einen festgelegten Schwellenwert notwendig sind [130].

Standardkurve

Standardkurven dienen zur Bestimmung der Konzentration einer Substanz in einer unbekannt Probe durch Vergleich dieser Probe mit einer Reihe von Standardproben, bekannter Konzentration. Zur Erstellung einer Standardkurve werden Detektionssignale (y-Achse) gegen den Logarithmus der Anfangsquantitäten (x-Achse) der untersuchten Standardproben in einem zweidimensionalen Koordinatensystem aufgetragen. Es entsteht ein Graph durch die ermittelten Punkte. Wenn nun ein bestimmtes Signal eine Nukleotidsequenz in einer beliebigen Probe nachweist, kann aufgrund der Signalstärke die Anfangsquantität auf der x-Achse abgelesen werden und muss somit nicht mehr errechnet werden. Die Steigung der Regressionsgeraden der Standardkurve sollte zwischen -3,2 und -3,4 betragen [130].

3.2. Material

3.2.1. Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

| Bezeichnung | Hersteller | Anwendung |
|--|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Cell lysis solution (CLS) | Qiagen, Hilden, Deutschland | DNA-Extraktion |
| DNA hydration solution | Qiagen | DNA-Extraktion |
| Entmineralisiertes Wasser | Anlage im Haus | Gelelektrophorese |
| Ethanol 70 % | Carl Roth, Darmstadt, Deutschland | DNA-Extraktion |
| Ethanol 96 % | AppliChem, Darmstadt, Deutschland | DNA-Extraktion |
| Hypochlorid (NaOCl x H ₂ O) | Nalgene, 4000 Roskilde, Dänemark | Flächenreinigung |
| Isopropanol (2-Propanol) | Carl Roth | DNA-Extraktion |
| Protein Precipitation Solution (PPS) | Qiagen | DNA-Extraktion |
| TBE Puffer 10 % | Carl Roth | Gelelektrophorese |
| Beta-(2)-Mercaptoethanol | AppliChem | DNA-Extraktion, RNA-Extraktion |
| RNase Away | Carl Roth | RNase Dekontamination |
| DEPC behandeltes Wasser | Carl Roth | DNA-Extraktion, RNA-Extraktion, PCR |

3.2.2. Enzyme

Tabelle 3: Enzyme

| Bezeichnung | Hersteller | Anwendung |
|-----------------------|--|----------------------------------|
| Ampli Taq Gold | Applied Biosystems, Frankfurt, Deutschland | PCR (DNA Polymerase) |
| Lysozym 10 mg/ml | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland | DNA Extraktion RNA-Extraktion |
| Proteinase K 20 mg/ml | Qiagen | DNA Extraktion RNA-Extraktion |

3.2.3. Nukleotide und Nukleinsäuren

Tabelle 4: Nukleotide und Nukleinsäuren

| Bezeichnung | Sequenz | Hersteller | Anwendung |
|--------------------------------------|---|--|---|
| dNTP's | | Applied Biosystems | PCR |
| 100 bp DNA-Leiter | | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland | Gel-Elektrophorese |
| 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus | | SolisBioDyne, Tartu, Estland | qPCR |
| Primer MU16 TF | 5' cga tct gcc ctg cac ttc '3 | TibMolbiol, Berlin, Deutschland | RT-qPCR |
| Primer MU16 TR | 5' cca cac cgc aaa agc tt '3 | TibMolbiol | RT-qPCR |
| Sonde MU16 TP | 5' 6FAM-cac agg aca tga atc ccg tgg tc-BBQ '3 | TibMolbiol | RT-qPCR |
| Primer IS2404 TF | 5' aaa gca cca cgc agc atc t '3 | TibMolbiol | qPCR |
| Primer IS2404 TR | 5' agc gac ccc agt gga ttg '3 | TibMolbiol | qPCR |
| Sonde IS2404 TP2 | FAM-ccg tcc aac gcg atc ggc a- BBQ '3 | TibMolbiol | qPCR |
| Primer T13 | 5' tgc aca cag gcc aca agg ga'3 | TibMolbiol | Konventionelle PCR zur Generierung des 16S Standards |
| Primer T39 | 5'cg aac ggg tga gta aca cg'3 | TibMolbiol | Konventionelle PCR zur Generierung des 16S Standards |
| IS2404-Standard (kloniertes Plasmid) | | Gen Express, Berlin, Deutschland | Standardkurve (exakte qPCR Quantifizierung), Positivkontrolle |
| 16S-Standard | | mittels konventioneller PCR generiert, Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin, München, Deutschland | Standardkurve (exakte qPCR Quantifizierung) |

| Bezeichnung | Sequenz | Hersteller | Anwendung |
|-------------------------|--|--|------------------------|
| IPC-Mix | | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland | Ausschluss PCR-Hemmung |
| Sequenz 16S-Amplikon | 5'cga tct gcc ctg cac ttc ggg ata agc ctg gga aac tgg gtc taa tac cgg ata gga cca cgg gat tca tgt cct gtg gtg gaa agc ttt tgc ggt gtg g'3. | | RT-qPCR |
| Sequenz IS2404-Amplikon | 5'agc gac ccc agt gga ttg gtg ccg atc gcg ttg gac ggc aag atg ctg cgt ggt gct tt'3. | | qPCR |

3.2.4. Reagenzien

Tabelle 5: Reagenzien

| Bezeichnung | Hersteller | Anwendung |
|--|---|---|
| AllPrep DNA/RNA Micro Kit | Qiagen | DNA/RNA-Extraktion |
| QuantiTect Reverse Transcription Kit | Qiagen | Reverse Transkription |
| Quant-iT PicoGreen Assay Kit | Invitrogen | Fluorometrische Quantifizierung von PCR-Produkten |
| Glycerin | Carl Roth | Bestandteil der Transportmedien PANTA und LTM |
| PANTA (Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim und Azlocillin) | Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland | Bestandteil der Transportmedien PANTA und LTM |
| Dubos Medium Albumin | Becton Dickinson | Bestandteil des PANTA Transportmediums für Mykobakterien |
| Dubos Broth Base | Becton Dickinson | Bestandteil des PANTA Transportmediums für Mykobakterien |
| Difco Middlebrook 7H9 Broth | Becton Dickinson | Bestandteil von LTM, Transportmedium für viable Mykobakterien |
| Bacto Casitone | Becton Dickinson | Bestandteil von LTM, Transportmedium für viable Mykobakterien |

| Bezeichnung | Hersteller | Anwendung |
|---|-------------------|---|
| BBL Middlebrook OADC Enrichment | Becton Dickinson | Bestandteil von LTM, Transportmedium für viable Mykobakterien |
| Löwenstein-Jensen Medium | Becton Dickinson | Kulturelle Anzucht von Mykobakterien |
| Exogenous internal positive control (IPC) reagent | Invitrogen | PCR |
| RNA-Protect | Qiagen | RNA Stabilisierung |

3.2.5. Geräte

Tabelle 6: Geräte

| Bezeichnung | Hersteller | Modell/Seriennummer |
|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| Arbeitsbank ClanLaf, steril | Eppendorf, Hamburg, Deutschland | VRF 1206 |
| Drucker | Canon, Krefeld, Deutschland | LBP-800 |
| Kühlschrank | Liebherr, Biberach, Deutschland | KT 1414; Model 760024 |
| Kühlschrank | Bosch, Stuttgart, Deutschland | KS 155 TA 1F |
| Kühlschrank | Siemens, München, Deutschland | KG KT RR 16A |
| Mikrowelle | Privileg, Stuttgart, Deutschland | 8017 E |
| Eisflockenbereiter | Scotsman, Mailand, Italien | AF 80 AS, DD6798 |
| Tiefkühlschrank | AEG, Nürnberg, Deutschland | KS155TA |
| Tiefkühlschrank | Liebherr | GP 1456 Mod. 461494 |
| Tiefkühlschrank | Liebherr | GSS 3666 |
| Thermocycler CFX96 | BioRad, München, Deutschland | CFX96 |
| Ultraviolett Transilluminator | UniEquip, Planegg, Deutschland | UT 1150207 |
| Vortex | Reamix, Sondheim, Deutschland | Assistent Reamix 2789 |
| Vortex | neoLab, Heidelberg, Deutschland | Vortex Genie, K-550-GE |
| Netzteil (Gelkammer) | BioRad | Power Pack 300 |
| Fluorometer | Invitrogen | Qubit 2.0 |

3.2.6. Weiteres Labormaterial

Tabelle 7: Weiteres Labormaterial (NA= nicht verfügbar)

| Bezeichnung | Hersteller/Lieferant | Anwendung |
|---|--|---|
| Handschuhe (Safe Skin PFE) | Kimberly-Clark, Koblenz, Deutschland | DNA-Extraktion, PCR |
| Handschuhe (Safe Skin Nitrile) | Kimberly-Clark | PCR |
| Mikroschraubröhrchen 2,0 ml | Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland | Transport von diagnostischem Material, DNA-Extraktion |
| Mikro-Tube 0,2 ml | Kisker Biotech | PCR |
| Pipettenspitzen, Safe Seal Tips; 10µl, 100µl, 1000µl | Kisker Biotech | DNA-Extraktion, PCR |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml | Kisker Biotech | DNA-Extraktion |
| Sterile Einmal-Skalpelle Gr.10 | Braun, Melsungen, Deutschland | DNA-Extraktion |
| Sterile Einmal-Pinzetten | Servoprax, Wese, Deutschland | DNA-Extraktion |
| Sterile Einwegspritzen, 0,5 ml | Braun | DNA-Extraktion |
| Sterile Einmalkanülen, 21G | Braun | DNA-Extraktion |
| 96-Well-Multiplates, transparent, mit Verschlussfolie | BioRad | PCR |
| Eisbehälter, Eis | NA | Reverse Transkription |

3.2.7. Diagnostisches Probenmaterial

Aus 25 *M. ulcerans*-Kulturen sowie aus 4 klinischen Proben ghanaischer Buruli Ulkus Patienten wurden in der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin München 29 *M. ulcerans*-DNA und -RNA Extrakte hergestellt.

Tabelle 8: *M. ulcerans* Kulturen und Patientenproben, die zur Entwicklung und Validierung des 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assay verwendet wurden (Kapitel 3.3.3. bis 3.3.6.1.).

| MU Stamm/ Probennummer | Herkunft | Material |
|---------------------------|----------|-------------|
| K4s-C1 | Kamerun | Kulturprobe |
| K4s-C2 | Kamerun | Kulturprobe |
| K4s-C3 | Kamerun | Kulturprobe |
| K5d-C1 | Kamerun | Kulturprobe |
| K5d-C2 | Kamerun | Kulturprobe |
| K5d-C1 | Kamerun | Kulturprobe |
| K5d-C2 | Kamerun | Kulturprobe |
| K5d-C3 | Kamerun | Kulturprobe |
| K5d-C4 | Kamerun | Kulturprobe |
| K5s-C1 | Kamerun | Kulturprobe |
| K5s-C2 | Kamerun | Kulturprobe |
| K5s-C3 | Kamerun | Kulturprobe |

| MU Stamm/ Probennummer | Herkunft | Material |
|---------------------------|--------------|----------------|
| K5s-C4 | Kamerun | Kulturprobe |
| K5s-C5 | Kamerun | Kulturprobe |
| K7b-C1 | Kamerun | Kulturprobe |
| K7b-C2 | Kamerun | Kulturprobe |
| K7b-C3 | Kamerun | Kulturprobe |
| K7b-C4 | Kamerun | Kulturprobe |
| K7s-C1 | Kamerun | Kulturprobe |
| K7s-C2 | Kamerun | Kulturprobe |
| K12S-C1 | Kamerun | Kulturprobe |
| 941328-C1 | Ghana - KCCR | Kulturprobe |
| 07-C1 | Ghana - KCCR | Kulturprobe |
| DS1-C1 | Ghana - KCCR | Kulturprobe |
| 97680-C1 | Ghana - KCCR | Kulturprobe |
| G.A.P.001-C1 | Ghana | Patientenprobe |
| G.A.P.033-C1 | Ghana | Patientenprobe |
| G.A.P.071-C1 | Ghana | Patientenprobe |
| G.A.P.078-C1 | Ghana | Patientenprobe |

Tabelle 9: Bakterienstämme die zur Spezifitätsprüfung des 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assays verwendet wurden, Kapitel 3.3.6.2. (NRZ= Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien, Borstel, MVP= Max von Pettenkofer-Institut München, M.= Mycobacterium).

| Bakterienspezies | Herkunft | Material |
|-----------------------------------|----------|-------------|
| <i>Escherichia coli</i> | MVP | Humanisolat |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | MVP | Humanisolat |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | MVP | Humanisolat |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | MVP | Humanisolat |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | MVP | Humanisolat |
| <i>M. goodnae</i> | NRZ | Humanisolat |
| <i>M. avium</i> | NRZ | Humanisolat |
| <i>M. abscessus</i> | NRZ | Humanisolat |
| <i>M. kansasii</i> | NRZ | Humanisolat |
| <i>M. xenopi</i> | NRZ | Humanisolat |
| <i>M. fortuitum</i> | NRZ | Humanisolat |
| <i>M. intracellulare</i> | NRZ | Humanisolat |
| <i>M. marinum</i> | NRZ | Humanisolat |
| <i>M. malmoense</i> | NRZ | Humanisolat |
| <i>M. africanum</i> | NRZ | Humanisolat |
| <i>M. bovis</i> | NRZ | Rindisolat |
| <i>M. microti</i> | NRZ | Mausisolat |
| <i>M. tuberculosis</i> | NRZ | Humanisolat |

Tabelle 10: Proben von Buruli Ulkus Patienten vor antibiotischer Therapie (Dauer = Zeitdauer seit Auftreten der Läsion, NA = nicht verfügbar). Diese Proben wurden für klinische Validierung verwendet (Kapitel 3.3.9).

| Probennummer Patient | Dauer (Wochen) | Herkunft | Art der Probe |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------------------|----------------------|
| G.A.P.055 | NA | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.A.P.056 | 6 | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| TP/003 | 4 | Tepa Governmental Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| TP/004 | 9 | Tepa Governmental Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.A.P.057 | 4 | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.A.P.085 | 8 | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.A.P.086 | 2 | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.A.P.087 | 10 | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.T.P.032 | NA | Tepa Governmental Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.A.P.102 | 3 | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.A.P.103 | 8 | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.A.P.104 | 9 | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.A.P.105 | 3 | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.A.P.106 | 3 | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.A.P.107 | 1 | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.A.P.108 | 2 | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.A.P.109 | 2 | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.T.P.051 | 3 | Tepa Governmental Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.T.P.053 | 4 | Tepa Governmental Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.T.P.054 | 3 | Tepa Governmental Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| TP.002 | NA | Tepa Governmental Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| TP.006 | NA | Tepa Governmental Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| TP.007 | NA | Tepa Governmental Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| TP.001 | NA | Tepa Governmental Hospital, Ghana | Wundabstrich |

Tabelle 11: Proben von DRB-PCR positiven Patienten nach achtwöchiger antibiotischer Therapie. Diese Proben wurden für klinische Validierung verwendet (Kapitel 3.3.9.).

| Patient Nr. | Herkunft | Art der Probe |
|--------------------|------------------------------------|----------------------|
| G.A.P.072 | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.A.P.073 | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.A.P.080 | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.A.P.086 | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.A.P.091 | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.A.P.093 | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |
| G.A.P.096 | Agogo Presbyterian Hospital, Ghana | Wundabstrich |

3.2.8. Computerprogramme

Tabelle 12: Computerprogramme

| Bezeichnung | Hersteller/Herausgeber | Anwendung |
|-----------------------|--|---|
| BLASTN Datenbank-Tool | NCBI, Bethesda, USA | In silico Spezifitätstestung |
| DNAsis Max | MiraiBio Group, South San Francisco, USA | DNA/RNA Sequenzanalyse |
| Primer 3 | Online-Werkzeug [132] | Primer Entwicklung |
| Excel | Microsoft, Redmond, USA | Statistische Auswertung, Berechnung CI (Konfidenzintervall) |

3.3. Methoden

3.3.1. Ablauf

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *M. ulcerans*-spezifischer RNA-basierter Viabilitätsassay entwickelt. Dieser sollte mittels 16S-rRNA-RT-qPCR lebende Mykobakterien nachweisen. Geplant war eine Kombination mit einer IS2404-qPCR, um zusätzlich zur Viabilitätstestung eine höhere Spezifität des Assays und eine gleichzeitige Quantifizierung der *M. ulcerans*-Keimlast zu ermöglichen (siehe Abbildung 5). Der entwickelte Assay sollte mit RNA- und DNA-Extrakten aus *M. ulcerans*-Kulturen technisch validiert werden. Anschließend war eine klinische Validierung anhand von Patientenproben aus Ghana vorgesehen.

Der Eigenanteil der Arbeit bestand aus der Planung des Projekts, der Entwicklung und Testung der Methode, sowie der technischen und klinischen Validierung der 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR. Diese Arbeitsschritte fanden in der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der LMU (Ludwig-Maximilians-Universität) in München statt. Fallfindung, klinische Diagnostik, Probenentnahme, Routinediagnostik bei klinischer Validierung, Therapie der Patienten und Versand der Proben wurden vom Studienteam des KCCR (Kumasi Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine, Kumasi, Ghana) koordiniert.

Der Studienzeitraum war von April 2010 bis April 2013. Entwicklung und technische Validierung wurden bis Juni 2012 durchgeführt. Die Patienten wurden im zweiten Quartal 2012 rekrutiert und die klinische Validierung wurde im April 2013 abgeschlossen.

3.3.2. Primer und Sonden

Primer und Hybridisierungssonden wurden mit der Software DNAsis Max (MiraiBio, San Francisco, USA; siehe Tabelle 12) entwickelt. Für eine spezifische Amplifikation der *M. ulcerans*-16S-rRNA erfolgte ein Abgleich der 16S-rRNA-Gensequenzen mit verwandten mykobakteriellen Spezies und potenziellen Kontaminationskeimen der menschlichen Haut (Tabelle 9) (GenBank, National Center for Biotechnology Information [NCBI]). Für die simultane Quantifizierung mittels IS2404-qPCR wurden die von Fyfe *et al.* beschriebenen Primer verwendet [100]. Die in derselben Publikation beschriebene Hybridisierungssonde (Sonde IS2404 TP) wurde aus thermodynamischen Gründen modifiziert (Sonde IS2404 TP2, siehe Tabelle 4), um sie dem Temperaturoptimum von Primern und Sonden der 16S-rRNA-RT-qPCR anzupassen.

3.3.3. Kombinierte RNA/DNA Extraktion

Kulturextrakte und Wundabstriche wurden mit RNAProtect behandelt, um die Proben vor dem Abbau durch ubiquitär vorkommende RNAsen zu schützen und die RNA bei Raumtemperatur zu stabilisieren. Um in den nächsten Schritten nicht mit infektiösen Mykobakterien zu arbeiten, erfolgte zunächst eine thermische Inaktivierung viabler Kulturextrakte bei 95°C über 5 Minuten. Daraufhin konnte die Extraktion beider Nukleinsäuren (siehe Protokoll 4 im Anhang) mit dem „All-Prep DNA/RNA extraction kit“ (Qiagen) durchgeführt werden. Die extrahierten RNA-Proben mussten einem gDNA-Wipeout (gDNA: genomische DNA, engl.: genomic DNA) unterzogen werden, bei welchem die genomische DNA enzymatisch abgebaut wird, und die RNA frei von Verunreinigung durch DNA zurückbleibt. Um die RNA im Anschluss mittels PCR nachweisen zu können, musste diese in cDNA umgeschrieben werden. Diese reverse Transkription erfolgte mittels „QuantiTect Reverse Transcription Kit“ (Qiagen). Dabei wurden „random hexamer primer“ verwendet, d.h. eine Mischung aller erdenklichen 6-Nukleotid-Sequenzen mit der Struktur 5' – d(NNNNNN) – 3', wobei N= G (Guanin), A (Adenin), T (Thymin) oder C (Cytosin) entspricht. Diese Oligonukleotide binden willkürlich an verschiedene Abschnitte der RNA und bilden die Ansatzpunkte für die reverse Transkription in cDNA. Diese cDNA sollte anschließend in der kombinierten 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR eingesetzt werden.

3.3.4. Real-Time qPCR

Eine PCR ermöglicht eine spezifische Amplifikation von DNA Sequenzen und damit deren Nachweis in einer Probe. Bei der quantitativen qPCR wird durch spezifische Fluoreszenzsonden ein Nachweis in Echtzeit (engl.: real time) möglich, da durch Messung der Fluoreszenz die Amplifikation mitverfolgt werden kann. Ebenso kann eine Quantifizierung erfolgen, da die Intensität des Fluoreszenzsignals mit der Anfangsquantität der Nukleinsäuren korreliert [130, 133].

Diese Anfangsquantität kann mit der Formel der Standardkurve der IS2404-qPCR $y = -3.35x + 39,1$ errechnet werden. Für y wurden die Ct-Werte (Definition siehe 3.1.) der IS2404-qPCR eingesetzt und die Gleichung nach x aufgelöst, mit $x =$ Kopienzahl der IS2404. Es wurde von durchschnittlich 207 IS2404-Kopien pro *M. ulcerans*-Genom ausgegangen [78]. Nach Division von x durch 207 erhält man demnach die Anfangsquantität. Durch diese Berechnung konnte die Keimlast (engl.: bacterial load) in den einzelnen Proben bestimmt werden.

Aus der extrahierten DNA und der revers-transkribierten RNA sollten bei der kombinierten 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR zwei verschiedene Nukleotidsequenzen zeitgleich innerhalb eines qPCR-Laufs vervielfältigt werden. Es wurden zwei unterschiedliche Reaktionsmischungen in die jeweiligen Reaktionsgefäße eingebracht (siehe Tabellen 13 und 14). Für beide wurde ein identisches Amplifikationsprotokoll verwendet (siehe Tabelle 15). Zu Ablauf und Interpretation der qPCR siehe auch Protokoll 4 im Anhang.

Zur Amplifikation der RNA wurde eine 100 bp lange Sequenz nahe dem 5' Ende des 16S-rRNA-Gens gewählt, da diese eine spezifische Amplifikation der *M. ulcerans* 16S-rRNA-Gens erlaubt. Ein Abgleich mit dem Genom verwandter Spezies und die Entwicklung von Primern und Hybridisierungssonden erfolgte mit der Software DNAsis Max (siehe 3.3.2.). Die Sequenz des 16S-Amplikons lautet: 5'cgatctgccc tgcacttcgg gataagcctg ggaaactggg tctaataccg gataggacca cgggattcat gtctgtggt ggaaagcttt tgcggtgtgg'3.

Aus der extrahierten DNA erfolgte die Amplifikation einer 59 bp langen Sequenz der IS2404. Folgende Sequenz wurde verwendet:

5'agcgacccca gtggattggt gccgatcgcg ttggacggca agatgctgcg tgggtgcttt'3 [100].

Tabelle 13: Reaktionsmischung 16S-rRNA-qPCR zum Nachweis von *M. ulcerans* cDNA aus RNA

| Reagenz | Volumen in µl | Stammlösung | Endkonzentration |
|---------------------------|---------------|-------------|------------------|
| DEPC H ₂ O | 8,60 | - | - |
| MU16S TF | 1,00 | 10µM | 0,5µM |
| MU16S TR | 1,00 | 10µM | 0,5µM |
| MU16S TP | 1,00 | 5µM | 0.25µM |
| qPCR Mix Plus | 4,00 | 5 U/µl | 1 U/µl |
| Exo IPC Mix | 2,00 | 10x | 1x |
| Exo IPC DNA | 0,40 | 50x | 1x |
| gesamt [µl] | 18,00 | | |
| Template cDNA [µl] | 2,00 | | |
| Endvolumen [µl] | 20,00 | | |

Tabelle 14: Reaktionsmischung IS2404-qPCR zum Nachweis von *M. ulcerans* DNA

| Reagenz | Volumen in µl | Stammlösung | Endkonzentration |
|---------------------------|---------------|-------------|------------------|
| DEPC H ₂ O | 8,60 | - | - |
| IS2404 TF | 1,00 | 10µM | 0,5µM |
| IS2404 TR | 1,00 | 10µM | 0,5µM |
| IS2404 TP2 | 1,00 | 5µM | 0.25µM |
| qPCR Mix Plus | 4,00 | 5 U/µl | 0,025 U/µl |
| Exo IPC Mix | 2,00 | 10x | 1x |
| Exo IPC DNA | 0,40 | 50x | 1x |
| gesamt [µl] | 18,00 | | |
| Template cDNA [µl] | 2,00 | | |
| Endvolumen [µl] | 20,00 | | |

Die Reaktionsmischungen mit den entsprechenden Proben wurden in ein 96-Well-Multiplate Reaktionsgefäß pipettiert, versiegelt und im Thermocycler amplifiziert. Der BioRad CFX96 Thermocycler wurde nach Herstellerangaben auf den in Tabelle 15 dargestellten Ablauf programmiert.

Tabelle 15: Thermocycler Programmierung

| Schritte | Temperatur | Dauer | Anzahl der Zyklen |
|---------------------------------|------------|-------------|-------------------|
| 1. Initiale Denaturierung | 95°C | 15 Minuten | 1 |
| 2. Denaturierung | 95°C | 15 Sekunden | 40 |
| 3. Primeranlagerung & Extension | 60°C | 60 Sekunden | |

Exponentialkurven wurden beim qPCR-Lauf als positives Signal einer spezifischen Amplifikation interpretiert, fehlende Kurven hingegen als negatives Ergebnis.

3.3.5. Qualitätskontrolle

Zur Qualitätskontrolle der 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR wurden Positiv-, Negativ- sowie „Wipeout“-Kontrollen verwendet, die bei jeder qPCR mitgeführt wurden. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden zuerst die cDNA-Proben in die Proben-Platte pipettiert, gefolgt von den Negativ- und „Wipeout“-Kontrollen. Danach wurden die entsprechend gefüllten Vertiefungen der Platte verschlossen, bevor die DNA-Proben und Positivkontrollen pipettiert wurden. Alle Positiv- und Negativkontrollen werden in Tabelle 16 dargestellt.

3.3.5.1. Positivkontrollen

Eine exogene interne Positivkontrolle (IPC, TaqMan) wurde bei der kombinierten qPCR verwendet, um falsch-negative Ergebnisse durch Inhibition auszuschließen. Ein klonierter IS2404-Standard und die cDNA des *M. ulcerans*-Gesamttranskripts wurden als Positivkontrollen der IS2404 bzw. 16S-rRNA-qPCR verwendet.

3.3.5.2. Negativkontrollen

Um eine Kontamination mit *M. ulcerans*-DNA auszuschließen, wurden „no-template“ Kontrollen (H₂O anstelle von Probenmaterial) mit demselben Ablauf wie die Proben getestet (eine Kontrolle je qPCR-Lauf). Um eine Kontamination bereits bei der Extraktion auszuschließen, wurde eine negative Extraktionskontrolle bei jedem Lauf mit untersucht.

3.3.5.3. Wipeout-Kontrollen

Durch den gDNA-„Wipeout“ sollte die genomische DNA aus den RNA-Proben entfernt werden. Diese hätte andernfalls bei der folgenden 16S-rRNA-qPCR zu falsch-positiven Ergebnissen führen können. Um sicherzustellen, dass der gDNA-„Wipeout“ erfolgreich war, wurde eine negative „Wipeout“-Kontrolle pro cDNA-Probe durchgeführt. Dafür wurde ein Aliquot (2µl) von jeder Probe nach gDNA-„Wipeout“ abpipettiert. Dieses wurde ohne reverse Transkription mittels IS2404-qPCR getestet. Bei erfolgreichem gDNA-„Wipeout“ befand sich somit keine nachweisbare DNA in der „Wipeout“-Kontrolle.

Tabelle 16: Im 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assay verwendete Kontrollen

| Kontrolle | Ziel | Material |
|--------------------------------|--|---|
| gDNA „Wipeout“-Kontrolle | Ausschluss DNA-Kontamination der RNA-Extrakte nach gDNA-„Wipeout“ vor reverser Transkription | Aliquot von jedem RNA Extrakt |
| Interne Positivkontrolle | Ausschluss falsch negativer Ergebnisse durch Inhibition der qPCR | TaqMan exogenous internal positive control (IPC) |
| Positivkontrolle | Sicherstellen der adäquaten Funktion der qPCR | <i>M. ulcerans</i> -cDNA/ IS2404 Plasmid-Standard |
| „No-template“-Negativkontrolle | Ausschluss von Kontaminationen der qPCR-Reagenz | H ₂ O |
| Negative Extraktionskontrolle | Ausschluss von Kontaminationen während der Extraktion | H ₂ O |

3.3.6. Technische Validierung

3.3.6.1. Sensitivität

Zur Überprüfung der Sensitivität des Assays wurde mittels Standardkurve (Definition siehe 3.1.) das untere Detektionslimit (LOD, engl.: limit of detection) der 16S-rRNA-qPCR bestimmt. Die Testung wurde mit extrahierter DNA von 25 *M. ulcerans*-Stämmen aus Kamerun und Ghana durchgeführt, die auf Löwenstein-Jensen Medium kultiviert worden sind, sowie 4 Patientenproben ghanaischer Buruli Ulkus Patienten (siehe Tabelle 8). DNA wurde anstelle von RNA (oder cDNA) wegen der besseren Stabilität dieser Nukleinsäure verwendet. Für die 16S-rRNA-RT-qPCR wurden 16S-rRNA-Gen-Standards (935 bp) durch konventionelle PCR generiert [134]. Die PCR-Produkte wurden mittels Fluorometrie

quantifiziert, wobei durch die Anregung zur Fluoreszenz und deren Messung die Konzentration der Moleküle in einer Lösung errechnet werden kann. Das Gewicht eines Amplikons kann aufgrund des Gewichts der einzelnen Nukleinbasen und der bekannten Basenabfolge im Amplikon berechnet werden und beträgt für den 935 bp-Abschnitt 0.4835332344187 Attogramm (pro DNA-Einzelstrang). Aus diesem Gewicht und der durch Fluorometrie ermittelten Molekülmasse pro Milliliter konnte die Anzahl der Kopien in der Probe errechnet werden. Aus den Proben mit bekannter Anzahl an Amplikons wurde jeweils eine 5-Log Verdünnungsreihe von 3×10^6 (Standard Nr. 1) bis 3×10^2 Kopien (Standard Nr. 5) der 935 bp-Sequenz des 16S-rRNA-Gens hergestellt. Um die Intra-Assay-Variabilität zu untersuchen wurden die Standards im Vierfachansatz in einer 16S-rRNA-RT-qPCR getestet.

Für die IS2404-qPCR wurden zur Erstellung einer Standardkurve sowie zur Bestimmung des LOD geklonte IS2404-Plasmid-Standards (1047 bp, komplette Sequenz) verwendet (siehe Tabelle 4). Die Konzentration des Plasmids wurde fluorometrisch gemessen. Daraufhin konnte die Kopienzahl aufgrund der bekannten Masse einer Kopie berechnet werden. Die Masse einer Kopie der 1047 bp-Sequenz beträgt 0.5357934677893 Attogramm. In diesem Fall konnte eine 8-Log Verdünnungsreihe von 2×10^8 bis 2×10^1 Kopien des IS2404-Elements hergestellt werden, da eine höhere Anfangsquantität der nachzuweisenden Sequenz vorhanden war. Diese Verdünnungsreihe wurde ebenfalls im Vierfachansatz mittels IS2404-qPCR getestet.

Anhand der ermittelten Punkte der Standardkurve wurde jeweils eine Regressionsgerade definiert, die den Zusammenhang zwischen x- und y-Werten ausdrückt.

Für die Standardkurven wurden die Korrelationskoeffizienten ermittelt. Ein Korrelationskoeffizient beschreibt den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen auf einer Skala. Bei Werten, die gegen 1 tendieren, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen den Merkmalen.

3.3.6.2. Spezifität

Zur *in silico* Spezifitätsbestimmung wurden die Zielsequenzen der 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR mit den entsprechenden Sequenzen der humanpathogenen Spezies *M. tuberculosis*, *M. marinum*, *M. leprae* sowie mit *Homo sapiens* DNA verglichen. Dazu wurde das BLASTN-tool (Basic Local Alignment Search Tool) des NCBI (National Center for Biotechnology Information) verwendet.

Bei der technischen Validierung wurden zur Spezifitätstestung DNA-Extrakte von insgesamt 18 mykobakteriellen Spezies verwendet, sowie von fünf Bakterienspezies, welche die Haut des Menschen besiedeln (siehe Tabelle 9).

3.3.6.3. *Intra- und Inter-Assay-Variabilität*

Zur Berechnung der Intra-Assay-Variabilität (Definitionen siehe 3.1.) wurden alle Experimente im Vierfachansatz durchgeführt. Um die Inter-Assay-Variabilität zu bestimmen, wurden alle PCR-Läufe an drei verschiedenen Tagen wiederholt.

Zur Angabe der Intra- und Inter-Assay-Variabilität wurde der Variationskoeffizient (engl.: „coefficient of variation“, CV) errechnet (Definition siehe 3.1.). Für eine effiziente qPCR muss laut MIQE Richtlinien (engl.: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) der Variationskoeffizient für die Intra-Assay-Variabilität weniger als 0,65 betragen und die maximale Variation unter 0,35 liegen. Bei der Inter-Assay-Variabilität muss der Variationskoeffizient kleiner 2,7 sein und die maximale Variation muss unter 0,8 liegen [130].

3.3.7. *Mykobakterielle Viabilität in Transportmedien*

Zur klinischen Validierung des 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assays mussten viable Mykobakterien in Patientenproben aus Ghana nach München transportiert werden. Um die Auswirkungen des Transportes auf die Viabilität der Mykobakterien in zwei verschiedenen Transportmedien (PANTA und LTM) zu untersuchen, sollte die Eignung der beiden Medien im direkten Vergleich getestet werden.

Das PANTA-Transportmedium besteht aus Dubos Broth Base, Dubos Medium Albumin, Glycerin und der Antibiotikamischung PANTA (Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim und Azlocillin) (Herstellungsprotokoll siehe Anhang, Protokoll S1). Das LTM (flüssiges Transportmedium, engl.: Liquid transport medium) wird aus Difco Middlebrook 7H9 Broth, Bacto Casitone, BBL Middlebrook OADC Enrichment, Glycerin sowie PANTA hergestellt (Herstellungsprotokoll siehe Anhang, Protokoll S1a). Beide Medien enthielten Antibiotika, um Kontaminationen zu vermeiden.

Die Transportmedien wurden mit viablen *M. ulcerans* aus Kulturen auf Löwenstein–Jensen Medium (Tabelle 8) inokuliert und bei jeweils 4°C und 31°C gelagert. Für die Dauer von 8

Wochen wurde die Nachweisbarkeit von RNA (Viabilität) und DNA mittels kombinierter 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR wöchentlich untersucht.

3.3.8. Mykobakterielle Viabilität nach Hitzeinaktivierung

Ein weiteres Experiment sollte untersuchen, wie rasch die Nachweisbarkeit von *M. ulcerans*-RNA, und damit die Viabilität des Bakteriums, nach Hitzeinaktivierung abnimmt. Zudem sollte gezeigt werden, dass *M. ulcerans*-DNA nach Hitzeinaktivierung der Mykobakterien weiter nachweisbar bleibt. Nach Hitzeinaktivierung der Mykobakterien bei 95°C für 15 Minuten wurde die Nachweisbarkeit der Nukleinsäuren mittels kombinierter 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR in 24h-Abständen 8 Wochen lang kontrolliert.

3.3.9. Klinische Validierung

Wie in 2.2. beschrieben, sollte zum Nachweis der Anwendbarkeit der neuen diagnostischen Methode im klinischen Alltag eine Studie mit Patientenproben durchgeführt werden. Patienten des KCCR aus dem Agogo Presbyterian Hospital, Ghana (14 Patienten), sowie dem Tepa Government Hospital, Ghana (10 Patienten), wurden für die Studie rekrutiert (siehe Abschnitt 3.3.9.2. für Kriterien zur Auswahl der Patienten). Während des Rekrutierungszeitraums im 2. Quartal 2012 konnten 24 Patienten vor Beginn der antibiotischen Behandlung in die Studie eingeschlossen werden (siehe Tabelle 10). Der Nachweis viabler *M. ulcerans* in den Patientenproben sollte mithilfe des 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assays erbracht werden.

Im selben Rekrutierungszeitraum wurden zusätzlich 7 Patienten des KCCR aus dem Agogo Presbyterian Hospital, Ghana, rekrutiert, deren antibiotische Therapie abgeschlossen, jedoch die Wundheilung unvollständig war (Siehe Tabelle 11). Trotz standardisierter achtwöchiger Chemotherapie mit Rifampicin (10mg/kg KG/d p.o.) und Streptomycin (15 mg/kg KG/d i.m.), zeigte sich eine Persistenz der Buruli Ulkus Läsionen dieser Patienten mit nur langsamer oder ausbleibender Wundheilung. Die Ätiologie der Wundheilungsstörungen war unklar. Vermutet wurde eine paradoxe Reaktion auf Antibiotikatherapie bzw. eine noch nicht vollständig beendete Wundheilung bei grundsätzlich erfolgreicher Therapie. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich in den Läsionen durch den 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assay RNA nachweisen lässt, und somit, ob die *M. ulcerans*-Eradikation durch antibiotische Behandlung und Chemotherapie erfolgreich war.

3.3.9.1. Ethische Voraussetzungen

Die Studie wurde vom "Committee of Human Research Publication and Ethics, School of Medical Sciences, Kwame Nkrumah University of Science and Technology (KNUST)", Kumasi, Ghana, (CHRPE/28/09) genehmigt (Genehmigung siehe Anhang 1). Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von allen Studienteilnehmern oder deren gesetzlichen Vertretern unterzeichnet. Zuvor erfolgte eine ausführliche Aufklärung der Patienten in ihrer Muttersprache über Ziele und Durchführung der Studie, sowie über das Recht der Patienten, ihr Einverständnis jederzeit zurückzuziehen.

3.3.9.2. Einschluss- und Ausschlusskriterien

Tabelle 17: Einschluss- und Ausschlusskriterien für die Buruli Ulkus Patienten vor Beginn der Therapie

| Einschlusskriterien | Ausschlusskriterien |
|---|--|
| Schriftliches Einverständnis vorliegend | Fehlende Einwilligung |
| Patient > 5 Jahre | Patient < 5 Jahre |
| Neu aufgetretener Fall (Krankheitsdauer 1-4 Wochen) | Rückfall/sekundäre Läsion (Krankheitsdauer > 4 Wochen) |
| Ulzerative Läsion/-en mit unterminierten Rändern | Ulzerative Läsion/-en mit vernarbten Rändern |
| Antibiotische Behandlung noch nicht begonnen | Antibiotische Behandlung bereits begonnen |

Tabelle 18: Einschluss- und Ausschlusskriterien für die Buruli Ulkus Patienten nach Therapieabschluss

| Einschlusskriterien | Ausschlusskriterien |
|--|---|
| Schriftliches Einverständnis vorliegend | Fehlende Einwilligung |
| Patient > 5 Jahre | Patient < 5 Jahre |
| Rückfall/sekundäre Läsion/-en (Krankheitsdauer > 4 Wochen) | Neu aufgetretener Fall (Krankheitsdauer 1-4 Wochen) |
| Wunde nicht vollständig verheilt | Wunde vollständig verheilt |
| Antibiotische Therapie abgeschlossen (56 Dosen) | Antibiotische Therapie nicht abgeschlossen |
| Jede Antibiotikadosis wurde appliziert | Therapietreue unsicher |

3.3.9.3. Probenentnahme

Zur klinischen Validierung wurden 24 Patientenproben untersucht. Die Proben stammen von Patienten mit ulzerativen Läsionen und klinischem Verdacht auf Buruli Ulkus, vor

Therapiebeginn (Agogo Presbyterian Hospital, Ghana (n = 14) und Tepa Government Hospital, Ghana (n= 10)) (Tabelle 10). Die Probenentnahme erfolgte nach WHO-Standards. Dabei wurden bei jedem Patienten, nach entsprechender Aufklärung zu Ablauf und Zweck des Verfahrens, drei Wundabstriche entnommen. Die Abstriche wurden durch rotierendes Streichen eines sterilen Wattetupfers mit leichtem Druck unter den unterminierten Rändern der Läsionen gesammelt [94]. Zwei Wundabstriche wurden in CLS (Zell-Lyselösung, engl.: cell lysis solution, siehe Tabelle 2) für die Routinediagnostik (Mikroskopie und DRB-PCR) asserviert. Für die Untersuchung mittels 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assay wurde der dritte Wundabstrich in PANTA asserviert. Jede Probe wurde mit Datum sowie einer Patienten-, Proben- und Labornummer versehen, und bis zum Versand entsprechend gelagert. Dieses Nährmedium hatte sich im Vergleich zu LTM für die Zwecke des Viabilitätsassays als äquivalent erwiesen und wurde aufgrund der einfacheren Herstellung verwendet.

Zusätzlich wurden Wundabstriche von sieben Patienten mit unvollständiger Wundheilung in Woche 9, nach Abschluss der antimykobakteriellen Therapie untersucht (Agogo Presbyterian Hospital, Ghana, siehe Tabelle 11). Die Patienten waren vor Beginn der antibiotischen Therapie mittels DRB-PCR am KCCR positiv auf *M. ulcerans* getestet worden. Auch hier wurden bei jedem Patienten, nach erfolgter Aufklärung, durch rotierendes Streichen eines sterilen Wattetupfers mit leichtem Druck unter den unterminierten Rändern der Läsionen drei Wundabstriche entnommen. Gleichfalls wurde einer der drei Wundabstriche für die Untersuchung mittels 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assay in PANTA asserviert. Die beiden anderen Wundabstriche wurden in CLS (Zell-Lyselösung, engl.: cell lysis solution, siehe Tabelle 2) für die Routinediagnostik (Mikroskopie und DRB-PCR) asserviert. Die Probenentnahme wurde vom KCCR Studienteam vor Ort durchgeführt.

3.3.9.4. Probenverarbeitung

Die entnommenen klinischen Proben wurden zunächst durch die Routinediagnostik untersucht. Hierzu wurden eine mikroskopische Untersuchung auf säurefeste Stäbchen und eine DRB-IS2404-PCR durchgeführt. Dies erfolgte durch das Studienteam am KCCR. Daraufhin erfolgte der Versand der Proben in PANTA Transportmedium an die Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der LMU München für die Untersuchung mittels 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assay. Den Versand führte ebenfalls das KCCR-Studienteam durch. Die Untersuchung durch den neu entwickelten 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assay wurde in Eigenarbeit in der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der LMU München, mit einem Thermocycler CFX96 (Bio-Rad, München, siehe Tabelle 6), durchgeführt. Die gewählte Thermocycler Programmierung wird in Tabelle 15 aufgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Technische Validierung

4.1.1. Sensitivität

In allen 29 zur technischen Validierung verwendeten *M. ulcerans*-Extrakten (siehe Tabelle 8) konnte *M. ulcerans*-rRNA und -DNA nachgewiesen werden. Zur Untersuchung der Inter-Assay-Variabilität wurden jeweils drei Standardkurven aufgestellt. Aus diesen wurde jeweils eine kombinierte Standardkurve berechnet werden (siehe Abbildung 6 und 7). Die Regressionsgerade war $y = -3.4x + 41,68$ für den 16S-rRNA-qPCR-Assay und $y = -3.35x + 39,1$ für den IS2404-qPCR-Assay. Der Korrelationskoeffizient R^2 war bei beiden Standardkurven >0.99 .

Das untere Detektionslimit (LOD) der 16S-rRNA-RT-qPCR lag bei sechs Kopien, das LOD der IS2404-qPCR bei zwei Kopien. Die Quantifizierung der 29 *M. ulcerans*-Extrakte ergab eine Keimlast zwischen 674 und 1590 Mykobakterien (siehe Tabelle 19).

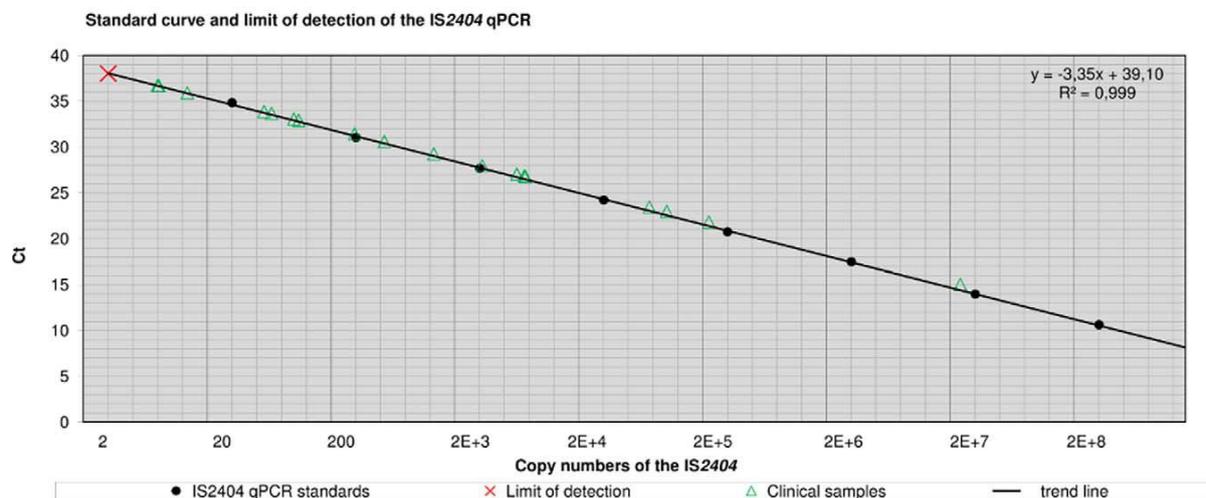


Abbildung 6: Standardkurve und LOD des IS2404-qPCR-Assays, zeigt die mittleren Ct-Werte (engl.: „cycle threshold“, Anzahl der Zyklen die für ein Ansteigen der Signalkurve über die Grenzwelle der Detektion notwendig sind) von drei durchgeführten Standardkurven-Versuchen, aufgetragen gegen die Anfangsquantität der Zielsequenz (= Copy numbers of the IS2404) in der Verdünnungsreihe. IS2404-qPCR standards: Siehe oben, Proben mit definierter Anzahl an IS2404-Kopien. Limit of detection = unteres Detektionslimit (LOD), Clinical samples = klinische Proben. Trend line = Trendlinie durch die ermittelten Punkte [135].

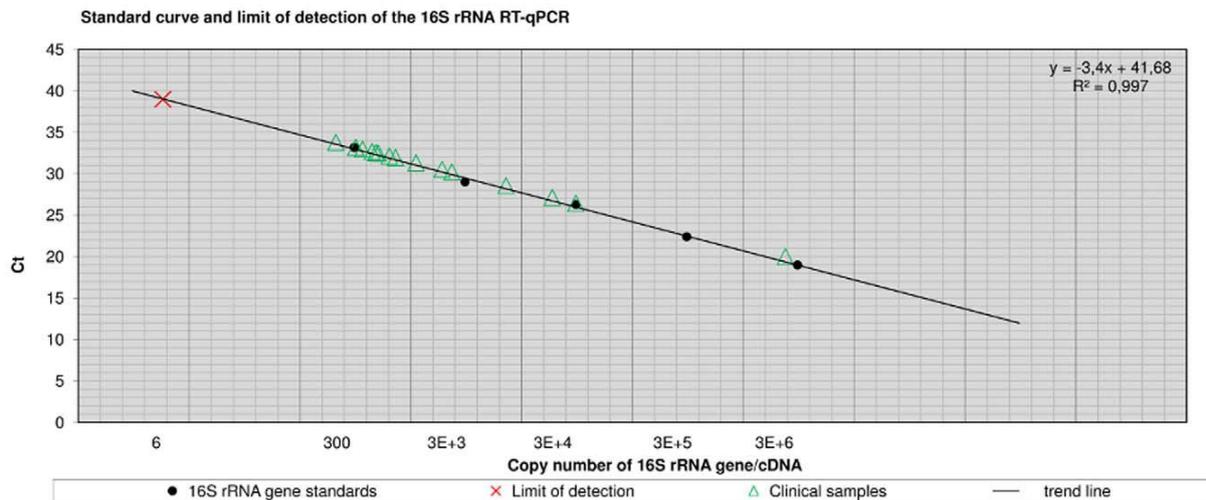


Abbildung 7: Standardkurve des 16S-rRNA-Assays, zeigt die mittleren Ct-Werte (engl.: „cycle threshold“, Anzahl der Zyklen die für ein Ansteigen der Signalkurve über die Grenzwelle der Detektion notwendig sind) von drei durchgeführten Standardkurven-Versuchen, aufgetragen gegen den Logarithmus zur Basis 10 der Anfangsquantität der Zielsequenz in der Verdünnungsreihe. 16S-rRNA gene standards: Siehe oben, Proben mit definierter Anzahl an 16S-rRNA-Kopien. Limit of detection = unteres Detektionslimit (LOD), Clinical samples = klinische Proben. Trend line = Trendlinie durch die ermittelten Punkte [135].

Tabelle 19: Ergebnisse der technischen Validierung, Nachweis der Nukleinsäuren RNA und DNA von *M. ulcerans*. Keimlast: errechnet mit der Formel der Standardkurve der IS2404-qPCR $y = -3.35x + 39,1$. Für y wurden die Ct-Werte der IS2404-qPCR eingesetzt und die Gleichung nach x aufgelöst mit x =Kopienzahl der IS2404. Zum Errechnen der Keimlast=Anzahl der Mykobakterien in der jeweiligen Probe wurde von einer IS2404 Kopienzahl von 207 pro *M. ulcerans*-Genom ausgegangen. Pos.=positiv.

| MU Stamm/ Probennummer | Nachweis MU RNA im 16S- rRNA-Assay | Nachweis MU DNA im IS2404- Assay | Keimlast |
|---------------------------|--|--|----------|
| K4s-C1 | pos. | pos. | 1023 |
| K4s-C2 | pos. | pos. | 876 |
| K4s-C3 | pos. | pos. | 1223 |
| K5d-C1 | pos. | pos. | 1003 |
| K5d-C2 | pos. | pos. | 978 |
| K5d-C1 | pos. | pos. | 744 |
| K5d-C2 | pos. | pos. | 1236 |
| K5d-C3 | pos. | pos. | 1038 |
| K5d-C4 | pos. | pos. | 1590 |
| K5s-C1 | pos. | pos. | 1467 |
| K5s-C2 | pos. | pos. | 1354 |
| K5s-C3 | pos. | pos. | 1330 |
| K5s-C4 | pos. | pos. | 988 |
| K5s-C5 | pos. | pos. | 1130 |
| K7b-C1 | pos. | pos. | 1236 |
| K7b-C2 | pos. | pos. | 1055 |
| K7b-C3 | pos. | pos. | 1203 |
| K7b-C4 | pos. | pos. | 1012 |
| K7s-C1 | pos. | pos. | 920 |
| K7s-C2 | pos. | pos. | 871 |
| K12S-C1 | pos. | pos. | 722 |
| 941328-C1 | pos. | pos. | 690 |
| 07-C1 | pos. | pos. | 685 |
| DS1-C1 | pos. | pos. | 674 |

4.1.2. Spezifität

Durch Analyse von DNA-Extrakten verwandter Spezies, sowie potenzieller Kontaminationskeime, konnte eine 100%ige Spezifität des kombinierten Assays nachgewiesen werden. *M. marinum* wurde in der 16S-rRNA-qPCR amplifiziert, hier war keine Differenzierung zu *M. ulcerans* möglich. In der simultan durchgeführten IS2404-qPCR war *M. marinum* jedoch negativ, da humanpathogene *M. marinum* Stämme (Erreger des Schwimmbadgranuloms, siehe Kapitel 1.4.) keine IS2404 aufweisen.

4.1.3. Intra- und Inter-Assay-Variabilität

Für den kombinierten Assay wies die Intra-Assay-Variabilität einen Variationskoeffizienten (CV) unter 0,65% auf. Die maximale Variation aller getesteten Proben innerhalb einer Testung lag unter 0,35. Somit wurde ein CV Wert unter 1,0% erreicht, welcher eine sehr geringe Intra-Assay-Variabilität demonstrierte [130, 136].

Die Inter-Assay-Variabilität wies einen CV unter 2,7% auf. Die maximale Variation lag unter 0,8. Ein CV unter 2,5% wurde ab Standard Nr. 2 erreicht (ab 200 Templates) und weist somit eine akzeptable Inter-Assay-Variabilität ab diesem Bereich auf [130, 136].

Die 16S-rRNA-RT-qPCR alleine wies einen maximalen CV von 0.49% (Intra-Assay-Variabilität) und 1.33% (Inter-Assay-Variabilität) auf, wohingegen die IS2404-qPCR für sich alleine einen maximalen CV von 0.65% (Intra-Assay-Variabilität) und 2.66% (für 20 Templates) bzw. 2,35% ab 200 Templates (Inter-Assay-Variabilität) erreichte (siehe auch Tabelle 20) [130, 136].

Tabelle 20: Intra- und Inter-Assay-Variabilität des 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assays. Ct-Variation = Variation der Ct-Werte innerhalb der gleichen Verdünnung / innerhalb drei Versuchstagen CV = Variationskoeffizient der Kopienzahl aus Proben im Vierfachansatz in der gleichen Verdünnung / an drei Versuchstagen. ΔCt max. = maximale Ct-Variation aller Proben in einem Lauf / an drei Versuchstagen. CV max. = maximaler CV aller Proben in einem Lauf / an drei Versuchstagen.

| qPCR Zielsequenz | Standard Nr. | Lauf Nr. 1 | | Lauf Nr. 2 | | Lauf Nr. 3 | | Intra-Assay-Variabilität | | Inter-Assay-Variabilität | | | |
|------------------|--------------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------------------------|-------------|--------------------------|--------|----------|-------------|
| | | Ct Variation | CV [%] | Ct Variation | CV [%] | Ct Variation | CV [%] | ΔCt max. | CV max. [%] | Ct Variation | CV [%] | ΔCt max. | CV max. [%] |
| 16S rRNA | 1 | 0.23 | 0.50 | 0.12 | 0.48 | 0.17 | 0.42 | 0.23 | 0.49 | 0.55 | 1.33 | 0.75 | 1.33 |
| | 2 | 0.09 | 0.19 | 0.16 | 0.30 | 0.19 | 0.35 | | | 0.24 | 0.53 | | |
| | 3 | 0.12 | 0.18 | 0.06 | 0.20 | 0.20 | 0.32 | | | 0.31 | 0.55 | | |
| | 4 | 0.15 | 0.22 | 0.17 | 0.25 | 0.12 | 0.22 | | | 0.75 | 1.15 | | |
| | 5 | 0.07 | 0.10 | 0.15 | 0.20 | 0.16 | 0.20 | | | 0.71 | 0.92 | | |

| qPCR Zielsequenz | Standard Nr. | Lauf Nr. 1 | | Lauf Nr. 2 | | Lauf Nr. 3 | | Intra-Assay- Variabilität | | Inter-Assay-Variabilität | | | |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|------------------------------|-------------------|--------------------------|-----------|---------------------|-------------------|
| | | Ct Variation | CV [%] | Ct Variation | CV [%] | Ct Variation | CV [%] | Δ Ct max. | CV max. [%] | Ct Variation | CV [%] | Δ Ct max. | CV max. [%] |
| IS2404 | 1 | 0.12 | 0.53 | 0.13 | 0.54 | 0.10 | 0.42 | 0.35 | 0.65 | 0.61 | 2.67 | 0.80 | 2.66 |
| | 2 | 0.18 | 0.65 | 0.15 | 0.48 | 0.18 | 0.57 | | | 0.71 | 2.35 | | |
| | 3 | 0.02 | 0.07 | 0.23 | 0.60 | 0.11 | 0.28 | | | 0.80 | 2.13 | | |
| | 4 | 0.18 | 0.39 | 0.14 | 0.28 | 0.10 | 0.22 | | | 0.80 | 1.76 | | |
| | 5 | 0.31 | 0.58 | 0.25 | 0.42 | 0.22 | 0.38 | | | 0.58 | 1.09 | | |
| | 6 | 0.15 | 0.23 | 0.31 | 0.47 | 0.20 | 0.32 | | | 0.31 | 0.58 | | |
| | 7 | 0.35 | 0.48 | 0.15 | 0.33 | 0.08 | 0.29 | | | 0.74 | 1.10 | | |

4.2. Mykobakterielle Viabilität in Transportmedien

Die Versuchsreihe zur Viabilität von *M. ulcerans* in Transportmedien ergab, dass *M. ulcerans* in beiden Medien, PANTA und LTM, mittels 16S-rRNA-RT-qPCR bis zum Ende des Versuchs nach 8 Wochen nachgewiesen werden konnte. Dies gelang sowohl bei Lagerung bei 31°C als auch bei 4°C. Somit eignen sich beide Medien für Lagerung und Transport viabler Mykobakterien über mindestens 8 Wochen.

4.3. Mykobakterielle Viabilität nach Hitzeinaktivierung

Bei einer weiteren Versuchsreihe zur *M. ulcerans*-Viabilität sollte gezeigt werden, wie lange *M. ulcerans*-RNA nach Hitzeinaktivierung bei 95°C über 15 Minuten nachweisbar bleibt. Die Nachweisbarkeit von RNA durch die 16S-rRNA-RT-qPCR nahm innerhalb von 6-12h signifikant ab. Nach 24h konnte keine RNA mehr nachgewiesen werden. *M. ulcerans*-DNA konnte hingegen bis zum Ende des Versuchs nach 8 Wochen mittels IS2404-qPCR nachgewiesen werden. Somit musste die RNA-Extraktion bei Entwicklung und Validierung des 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assays innerhalb von sechs Stunden nach der Hitzeinaktivierung durchgeführt werden, um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass *M. ulcerans*-DNA nach Hitzeinaktivierung mindestens acht Wochen persistiert.

4.4. Klinische Validierung

Von den 24 Wundabstrichen, welche vor antimykobakterieller Therapie entnommenen worden waren, wurden in der Routinediagnostik mittels DRB-PCR 12 Proben (50%) positiv und 12 Proben (50%) negativ getestet. Mittels IS2404-qPCR konnten hingegen 18 dieser

Wundabstriche (75%) positiv auf *M. ulcerans*-DNA getestet werden und sechs waren negativ (25%). RNA konnte mittels 16S-rRNA-RT-qPCR in 15 der 18 IS2404-qPCR-positiven Proben (83,3%) nachgewiesen werden. Die Quantifizierung der drei Proben, die mittels IS2404-qPCR als positiv, aber mittels 16S-rRNA-RT-qPCR als negativ identifiziert worden waren, ergab eine Keimlast unterhalb des LOD der 16S-rRNA-RT-qPCR (=sechs Templates). Alle 6 IS2404-qPCR-negativen Patienten (100%) waren ebenfalls in der 16S-rRNA-RT-qPCR negativ. Die Keimlast wurde mittels IS2404-Quantifizierung und einer angenommenen Zahl von 207 IS2404-Kopien pro *M. ulcerans*-Genom errechnet. Ergebnisse siehe auch Tabelle 21.

Alle sieben getesteten Abstriche von Probanden, die bereits eine antimykobakterielle Therapie absolviert hatten, waren 16S-rRNA-negativ (16S-rRNA-RT-qPCR) und IS2404-positiv (qPCR und DRB-PCR) (100%). In der Mikroskopie konnten keine säurefesten Stäbchen gefunden werden. Ergebnisse siehe auch Tabelle 22.

Tabelle 21: Ergebnisse der klinischen Proben der Patienten vor antibiotischer Behandlung, getestet mit dem molekularen 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Viabilitätsassay und konventioneller Diagnostik (mikroskopische Zählung nach Ziehl-Neelsen-Färbung und konventionelle IS2404-DRB-PCR. NA = nicht verfügbar, Neg. = negatives Ergebnis, Pos. = positives Ergebnis. Ct = Zyklusschwelle (engl.: cycle threshold). Keimlast: Anzahl der Mykobakterien in der Probe. Die Keimlast wurde errechnet mittels IS2404-Quantifizierung und einer angenommenen Zahl von 207 IS2404-Kopien pro *M. ulcerans*-Genom.

| Probennr. | Mikroskopie | DRB-PCR | IS2404-qPCR | 16S-rRNA-qPCR | Keimlast |
|-----------|-------------|---------|-------------|---------------|----------|
| G.A.P.055 | Neg | Neg | Neg | Neg | NA |
| G.A.P.056 | Pos | Pos | Pos | Pos | >1000 |
| TP/003 | Pos | Pos | Pos | Pos | 584 |
| TP/004 | Neg | Neg | Pos | Pos | 6-10 |
| G.A.P.057 | Neg | Neg | Pos | Neg | 1-5 |
| G.A.P.085 | Neg | Neg | Pos | Neg | 1-5 |
| G.A.P.086 | Neg | Neg | Pos | Neg | 1-5 |
| G.A.P.087 | Pos | Pos | Pos | Pos | 497 |
| G.T.P.032 | Neg | Neg | Neg | Neg | NA |
| G.A.P.102 | Pos | Pos | Pos | Pos | 42 |
| G.A.P.103 | Neg | Neg | Pos | Pos | 6-10 |
| G.A.P.104 | Neg | Neg | Pos | Pos | 6-10 |
| G.A.P.105 | Pos | Pos | Pos | Pos | 106 |
| G.A.P.106 | Pos | Pos | Pos | Pos | 261 |
| G.A.P.107 | Pos | Pos | Pos | Pos | 571 |
| G.A.P.108 | Neg | Pos | Pos | Pos | 6-10 |
| G.A.P.109 | Pos | Pos | Pos | Pos | 24 |
| G.T.P.051 | Pos | Pos | Pos | Pos | >1000 |
| G.T.P.053 | Pos | Pos | Pos | Pos | >1000 |
| G.T.P.054 | Pos | Pos | Pos | Pos | >1000 |
| TP.002 | Neg | Neg | Neg | Neg | NA |
| TP.006 | Neg | Neg | Neg | Neg | NA |
| TP.007 | Neg | Neg | Neg | Neg | NA |
| TP.001 | Neg | Neg | Neg | Neg | NA |

Tabelle 22: Ergebnisse der klinischen Proben der Patienten nach antibiotischer Behandlung, getestet mit dem molekularen 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR Viabilitätsassay und konventioneller Diagnostik (mikroskopische Zählung nach Ziehl-Neelsen-Färbung und konventionelle IS2404-DRB-PCR. NA=nicht verfügbar. Pos=positiv, Neg=negativ.

| Patient | Mikroskopie | DRB-PCR | IS2404-qPCR | 16S-rRNA-qPCR | Keimlast |
|-----------|-------------|---------|-------------|---------------|----------|
| G.A.P.072 | Neg | Pos | Pos | Neg | NA |
| G.A.P.073 | Neg | Pos | Pos | Neg | NA |
| G.A.P.080 | Neg | Pos | Pos | Neg | NA |
| G.A.P.086 | Neg | Pos | Pos | Neg | NA |
| G.A.P.091 | Neg | Pos | Pos | Neg | NA |
| G.A.P.093 | Neg | Pos | Pos | Neg | NA |
| G.A.P.096 | Neg | Pos | Pos | Neg | NA |

4.5. Qualitätskontrolle

Bei allen verwendeten Ergebnissen von Proben und qPCR-Läufen wurden die Negativkontrollen negativ und die Positivkontrollen positiv getestet. Eine Kontamination während der DNA-Extraktion wurde durch negative Ergebnisse der Extraktionskontrolle bei sämtlichen Proben ausgeschlossen. Eine Inhibition der qPCR-Reaktion konnte durch die positive Testung der IPC ebenfalls ausgeschlossen werden. Die „Wipeout“-Kontrolle der RNA-Extrakte war negativ, womit eine Kontamination der cDNA-Proben mit gDNA ausgeschlossen werden konnte.

5. Diskussion im Hinblick auf zukünftige Anwendungen

Bei der Behandlung von mykobakteriellen Infektionskrankheiten wie dem Buruli Ulkus ist es wichtig, den Verlauf der Therapie zu überwachen und deren Erfolg sicherzustellen, weshalb eine zuverlässige Therapiekontrolle erforderlich ist. Sie ermöglicht es, die Therapiedauer den individuellen Bedingungen entsprechend flexibel anzupassen. Die Dauer der antibiotischen Standardtherapie zur Behandlung des Buruli Ulkus beträgt acht Wochen. Durch eine verlässliche Therapiekontrolle könnte diese Behandlung bei Bedarf verlängert oder verkürzt werden [123]. Dadurch könnte die Gefahr verringert werden, dass die Therapie bei sogenannten „slow healers“ zu früh beendet wird, oder die Behandlung – bei sich einstellendem Therapieerfolg – überflüssig lange fortgeführt wird [123].

Eine zuverlässige Therapiekontrolle kann auch für eine adäquate Nachsorge hilfreich sein. So können zum Beispiel Rezidive des Buruli Ulkus oder Reinfektionen mit *M. ulcerans* frühzeitig erkannt und behandelt werden.

Da es beim Buruli Ulkus zu paradoxen Reaktionen während und nach einer Behandlung mit Antibiotika kommen kann (Auftreten von Läsionen ohne viable Mykobakterien), müssen diese von den Rezidiven und Reinfektionen verlässlich differenzierbar sein. Nur so kann entschieden werden, ob eine erneute antibiotische Therapie indiziert ist, oder der Patient anderweitig behandelt werden soll.

Zudem lassen sich durch eine adäquate Therapiekontrolle neu entwickelte Therapien einfacher erproben und beurteilen.

Für eine zuverlässige Therapiekontrolle ist eine Nachweismethode viabler Mykobakterien erforderlich. Bisher war die Anzüchtung in Kulturen die Nachweismethode viabler *M. ulcerans*. Diese Methode hat jedoch bedeutende Nachteile, der Nachweis dauert lange und die Sensitivität der Kultivierung liegt bei nur 20-60 %.

Für *M. tuberculosis* und *M. leprae* wurden bereits Assays zum Nachweis mykobakterieller RNA entwickelt, welche eine schnelle und zuverlässige Detektion viabler Mykobakterien ermöglichen [124, 127, 128, 137]. In dieser Arbeit wurde nun auch für *M. ulcerans* ein Assay zum RNA-Nachweis entwickelt. Der Assay soll den spezifischen Nachweis sich replizierender *M. ulcerans* ermöglichen. Mit dieser neuen Methode wird eine Therapiekontrolle in einem deutlich kürzeren Zeitrahmen als bisher ermöglicht. Durch eine sequenzielle Analyse von Probenmaterial während der Behandlung könnte der Erfolg der

Therapie durch Abnahme viabler Mykobakterien verifiziert und dokumentiert werden. Außerdem könnten die adäquate Dauer der Therapie sowie der angemessene Zeitpunkt für einen Wechsel des therapeutischen Vorgehens bestimmt werden.

Mit Hilfe des neu entwickelten 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assays könnte erstmals schnell und zuverlässig zwischen Therapieversagen, Rezidiven der Erkrankung, Reinfektionen und paradoxen Reaktionen differenziert werden. Die gewonnene Erkenntnis hat, wie oben erläutert, einen entscheidenden Einfluss auf die weiterführende therapeutische Strategie.

Die zuvor beschriebenen Einsatzmöglichkeiten des neuen Assays wurden bereits in einem Fallbericht und in Folgestudien untersucht.

In einem 2012 von unserer Arbeitsgruppe veröffentlichten Fallbericht wurde bei einem Patienten ein Buruli Ulkus diagnostiziert. Ein Nodulus mit 3 cm Durchmesser war am linken Rippenbogen aufgetreten. Der Patient wurde mittels achtwöchiger Rifampicin/Streptomycin Standardtherapie behandelt und als geheilt entlassen. Nach neun Monaten wurde der Patient mit einer sekundären Läsion (Nodulus mit 3 cm Durchmesser am dorsalen rechten Oberschenkel) erneut vorgestellt. Mittels IS2404-qPCR wurde *M. ulcerans*-DNA nachgewiesen, jedoch konnte die Viabilitätstestung mittels 16S-rRNA-RT-qPCR keine lebenden *M. ulcerans* im Wundgebiet nachweisen. So konnte die gesicherte Diagnose einer paradoxen, immunologischen Reaktion auf die Behandlung mit Chemotherapeutika gestellt werden. Mit diesem Wissen konnte auf eine weitere antimykobakterielle Therapie verzichtet werden. Stattdessen erfolgte ein über zwei Wochen angelegtes, konservatives Management. Die Läsion heilte innerhalb von fünf Wochen vollständig aus [118].

Dieser Fall zeigt das differenzialdiagnostische Potenzial des neu entwickelten Assays bei unklarem klinischem Befund, sowie die daraus resultierende, optimale Therapiewahl.

In einer Studie des KCCR in Kooperation mit der LMU von 2014 wurde untersucht, wie schnell *M. ulcerans* durch die antibiotische Behandlung eliminiert wird. Dabei wurde der 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Viabilitätsassay verwendet. Die Studie umfasste 84 Patienten aus Ghana mit aktiver Buruli Ulkus Erkrankung, wobei die in dieser Arbeit zur klinischen Validierung rekrutierten Patienten eingeschlossen waren (Tabelle 10). Proben wurden vor, während (nach 4 und 8 Wochen) und nach der antibiotischen Behandlung (nach 12 Wochen) entnommen und mittels Viabilitätsassay untersucht. Bei 56% der Patienten waren die Läsionen nach Abschluss der Therapie ausgeheilt bzw. keine Erreger mehr nachweisbar. Bei 52% der Patienten mit nach acht bzw. zwölf Wochen nicht ausgeheilten Läsionen konnten

weiterhin viable Mykobakterien nachgewiesen werden. Die Läsionen mit verzögerter Heilung hatten vor Beginn der Therapie eine höhere Keimlast aufgewiesen, als die Läsionen, welche nach acht Wochen bereits vollständig abgeheilt waren. Aus diesen Ergebnissen wurde der Schluss gezogen, dass Patienten mit einer hohen Keimlast vor Beginn der Therapie von einer verlängerten antibiotischen Behandlung profitieren könnten. Eine achtwöchige Standardtherapie könnte sich als zu kurz erweisen, um zu einer vollständigen Eradikation von *M. ulcerans* zu führen [138]. Die Studie zeigt, dass die für jeden Patienten ideale Therapiedauer durch den kombinierten 16SrRNA-RT/IS2404-qPCR-Assay genauer als bislang möglich definiert werden kann.

In einer 2017 veröffentlichten Studie mit 129 Patienten aus Ghana wurde der kombinierte Viabilitätsassay ebenfalls zur Therapiekontrolle verwendet. In dieser Studie waren bei 52% der Patienten mit nicht ausgeheilten Läsionen nach acht Wochen antibiotischer Behandlung noch viable *M. ulcerans* nachweisbar. Läsionen mit verzögerter Heilung wiesen auch in dieser Studie eine höhere initiale Keimlast auf. Läsionen mit nicht nachweisbaren viablen Mykobakterien vor oder vier Wochen nach Therapiebeginn zeigten dagegen eine niedrige initiale Keimlast. Auch hier wurde gefolgert, dass Patienten mit einer initial hohen mykobakteriellen Keimlast von einer Verlängerung der Therapiedauer über acht Wochen hinaus profitieren könnten. Zudem könnte die Therapiedauer bei Läsionen mit einer niedrigen initialen Keimlast von acht auf vier Wochen verkürzt werden. Die Proben für den Viabilitätsassay wurden vor Beginn der antibiotischen Therapie, während dieser (nach 4 und 8 Wochen) sowie nach Beendigung der Therapie (nach 12 und 16 Wochen) entnommen [123]. Eine Empfehlung zu Frequenz und Zeitabständen der Anwendung des Viabilitätsassays zur Therapiekontrolle wurde jedoch nicht abgegeben, dies könnte Gegenstand künftiger Studien sein. Auch diese Studie zeigt, dass die in dieser Arbeit entwickelte Methode ein wichtiges Instrument zur Therapiekontrolle und Bestimmung der optimalen Therapiedauer ist.

Trotz der entscheidenden Vorteile gegenüber früheren Methoden weist auch dieses neu entwickelte Verfahren Nachteile auf. Dazu zählen die notwendige, hochwertige Laborausstattung und das entsprechend geschulte Personal. Eine internationale Kooperation adäquat ausgerüsteter Einrichtungen kann dabei eine wesentliche Hilfe für Gebiete mit limitierter Laborausstattung darstellen, Proben können an diese Einrichtungen versandt und dort analysiert werden. Durch die gute Ausstattung vor Ort in Ghana (qPCR-Geräte) müssen die Proben dort nicht versandt werden und die Untersuchungen können direkt vor Ort stattfinden.

Durch die notwendige Laborausstattung sowie den aufwendigen Versand der Proben nach Deutschland waren die Kosten für die Tests zunächst hoch. Sie betragen unter Studienbedingungen ca. 14 Euro pro Test. Der Zugang zu Transportmedien und die Entwicklung von Trockenreagenzien könnten die Verbreitung des 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assays verbessern. Die Kosten könnten sich in Zukunft zudem durch Standardisierung der Abläufe weiter reduzieren lassen.

Ein weiterer Nachteil struktureller Art der neu entwickelten Methode besteht darin, dass der RNA-Assay allein keine Quantifizierung der Mykobakterien erlaubt. Da RNA schnell durch ubiquitäre RNAsen abgebaut wird, ist ein Rückschluss auf die Anfangsquantität nicht möglich. Zur Quantifizierung muss die IS2404-DNA in einer simultanen qPCR mitbestimmt werden. Dies führt zu einem komplexeren Assay mit höherem Zeitaufwand und mehr durchzuführenden Arbeitsschritten. Die Einbeziehung der IS2404-qPCR hat jedoch nicht nur Nachteile, sie ist hochsensitiv und -spezifisch.

Der neu entwickelte Assay kann ein hilfreiches Testverfahren für die klinische Forschung sowie Diagnostik und Behandlung des Buruli Ulkus darstellen. In der Forschung kann der 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assay bei der Entwicklung neuer Therapien eine wichtige Rolle spielen und gleichzeitig dazu beitragen, die bestehende Standardtherapie mit größerer Präzision einzusetzen. Wie im obigen Fallbericht gezeigt, ermöglicht die neue Methode durch klare Differenzierung der Situation eine schnelle und individuelle Therapieentscheidung. Bei einer unnötig langen Therapie besteht sowohl die Gefahr von vermeidbaren Nebenwirkungen durch die eingesetzten Antibiotika als auch erhöhte Kosten durch personellen Aufwand, etwa bei Untersuchungen und Verabreichung der Injektionen. Bei zu kurzer Behandlungsdauer kann es, bei Patienten mit initial hoher Keimlast, zu protrahierten Heilungsverläufen mit langwierigen Wundheilungsstörungen oder Defektheilungen kommen. Dies kann zu persönlichem Leid und wirtschaftlichen Auswirkungen wie Arbeitsunfähigkeit führen. Zudem können chirurgische Eingriffe wie beispielsweise Amputationen stark betroffener Gliedmaßen oder die Remobilisierung von Gelenken notwendig werden.

Die 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR schließt eine elementare Lücke in der Diagnostik des *M. ulcerans*. Seit Entwicklung des Assays konnte dieser auch außerhalb dieser Arbeit eingesetzt werden und ist inzwischen eine mehrfach in Studien zur Therapie des Buruli Ulkus verwendete Methode [123, 138].

6. Zusammenfassung

Seit den 1980er Jahren wird in tropischen und subtropischen Gebieten gehäuft das Krankheitsbild des Buruli Ulkus beobachtet, welches durch eine Infektion mit *Mycobacterium ulcerans* hervorgerufen wird. Das Buruli Ulkus ist eine der häufigsten mykobakteriellen Erkrankungen. Bei den erkrankten Patienten sind vor allem die Haut und das subkutane Fettgewebe betroffen. Es bilden sich Läsionen unterschiedlicher Größe, die sich zu großflächigen Ulzerationen entwickeln können.

Nachdem bis 2004 die Behandlung des Buruli Ulkus hauptsächlich auf chirurgischen Eingriffen beruhte, kommt seither eine antimykobakterielle Therapie zum Einsatz. Diese von der WHO empfohlene Therapie besteht aus einer achtwöchigen Behandlung mit Rifampicin und Streptomycin.

Zur Diagnosesicherung stehen zahlreiche Verfahren zur Verfügung. Die sensitivste Methode ist die IS2404-PCR. Ein zeitaufwendiges, bisher jedoch einziges Verfahren zur Detektion viabler *M. ulcerans*, ist die Kultur auf Löwenstein-Jensen Medium.

Während und nach einer Antibiotikabehandlung des Buruli Ulkus treten bei einem Teil der Patienten paradoxe Reaktionen auf. Diese äußern sich in der Bildung neuer Läsionen oder dem Fortschreiten bereits vorhandener Läsionen. Es ist für die weitere Behandlung entscheidend, diese paradoxen Reaktionen von Läsionen, die auf Therapieversagen oder Rezidiven beruhen, differenzieren zu können. Der Nachweis von *M. ulcerans*-DNA eignet sich aufgrund ihrer hohen Stabilität und Persistenz nicht zur Differenzierung der Ursache der Läsionen.

Um einen bleibenden Therapieerfolg zu gewährleisten, ist es notwendig den Therapieverlauf fortwährend zu überwachen. Dabei sollten viable Erreger durch eine geeignete Methode möglichst schnell nachweisbar sein. Bisher stand nur die klinische Beobachtung als Therapieüberwachung zur Verfügung.

In dieser Arbeit wurde eine Methode zum Nachweis viabler *M. ulcerans*, der 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assay, entwickelt. Dabei wurde die bereits existierende Methode der IS2404-qPCR mit der hier neu entwickelten Methode 16S-rRNA-RT-qPCR kombiniert.

Zur Entwicklung des Assays wurden Kulturextrakte und Patientenproben verwendet. Es wurden Versuche zur simultanen Extraktion von *M. ulcerans*-RNA und -DNA und zur

reversen Transkription von RNA in cDNA durchgeführt. Zur spezifischen Amplifikation einer Sequenz der *M. ulcerans*-rRNA wurden Primer und Hybridisierungs sonden entwickelt. Zum Nachweis der extrahierten Nucleinsäuren von *M. ulcerans* wurde ein qPCR-Protokoll etabliert, welches zeitgleich zwei Nucleotidsequenzen amplifiziert.

Zur technischen Validierung wurden Kulturextrakte verwendet. In allen verwendeten Extrakten wurde *M. ulcerans*-DNA und rRNA nachgewiesen. Sensitivität und Spezifität wurden bestimmt. Das untere Detektionslimit lag bei sechs Kopien für die 16S-rRNA-RT-qPCR und zwei Kopien für die IS2404-qPCR. DNA-Extrakte verwandter Spezies und möglicher Kontaminationskeime wurden mit dem Assay getestet, wobei eine 100%ige Spezifität des kombinierten Assays nachgewiesen werden konnte.

Zur klinischen Validierung kamen 31 Patientenproben aus Ghana zum Einsatz. Dabei wurden 24 Patientenproben untersucht, die vor Beginn einer antimykobakteriellen Therapie entnommen wurden, und sieben Patientenproben, die nach erfolgter antimykobakterieller Therapie entnommen wurden. In 18 der 24 Proben, die vor Beginn einer antimykobakteriellen Therapie entnommen wurden, konnte mittels IS2404-qPCR *M. ulcerans*-DNA nachgewiesen werden (75%). In 15 der 18 *M. ulcerans*-positiven Proben wurde mittels 16S-rRNA-RT-qPCR der Nachweis von *M. ulcerans*-RNA erbracht (83,3%). Bei den drei IS2404-positiven aber 16S-rRNA-negativen Proben ergab die Quantifizierung eine Erregerdichte unterhalb des unteren Detektionslimits der 16S-rRNA-RT-qPCR. Alle sieben Patientenproben, die nach erfolgter antimykobakterieller Therapie entnommen wurden, waren IS2404-positiv und 16S-rRNA-negativ (100%).

In der Qualitätskontrolle wurden alle Negativkontrollen negativ und alle Positivkontrollen positiv getestet. Es konnte eine geringe Intra- und Inter-Assay-Variabilität gezeigt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen eine hohe Zuverlässigkeit des neu etablierten 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assays zum Nachweis von viablen *M. ulcerans*. Es wurde ein schnelles und effizientes Verfahren entwickelt, mit dem sich die antimykobakterielle Therapie von an Buruli Ulkus erkrankter Patienten kontinuierlich überwachen lässt. Der Assay wurde in Ghana in Studien zur Therapieoptimierung bereits mit Erfolg verwendet. Das Verfahren bietet einen schnell verfügbaren Nachweis zur Differenzialdiagnose sekundärer Läsionen und stellt zudem ein hilfreiches Instrument für zukünftige Medikamentenstudien dar. Die Etablierung des 16S-rRNA-RT/IS2404-qPCR-Assays kann somit zu einem Zuwachs an Therapiesicherheit führen und eine verbesserte Anpassung des klinischen Managements an jeden individuellen Buruli Ulkus Patienten ermöglichen.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Bamberger D, Jantzer N, Leidner K, Arend J, Efferth T. 2011, *Fighting mycobacterial infections by antibiotics, phytochemicals and vaccines*, Microbes Infect. 13(7): 613-23.
- [2] Barker DJ. 1971, *Buruli disease in a district of Uganda*, J Trop Med Hyg. 74(12): 260-4.
- [3] Jenkin GA, Smith M, Fairley M, Johnson PD. 2002, *Acute, oedematous Mycobacterium ulcerans infection in a farmer from far north Queensland*, Med J Aust. 176(4):180-1.
- [4] Johnson PD, Veitch MG, Leslie DE, Flood PE, Hayman JA. 1996, *The emergence of Mycobacterium ulcerans infection near Melbourne*, Med J Aust. 164(2):76-8.
- [5] MacCallum P, Tolhurst JC, Buckle G, Sissons HA. 1948, *A new mycobacterial infection in man. I. Clinical aspects. II. Experimental investigations in laboratory animals. III. Pathology of the experimental lesions in the rat. IV. Cultivation of the new mycobacterium*, pp. 1-30, JPB LX. 93-122.
- [6] WHO. 2018, *Buruli ulcer (Mycobacterium ulcerans infection). Fact Sheet No. 199*, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [7] Walsh DS, Portaels F, Meyers WM. 2011, *Buruli ulcer: Advances in understanding Mycobacterium ulcerans infection*, Dermatol Clin. 29(1): 1-8.
- [8] WHO. 2008, *Buruli ulcer: progress report, 2004-2008*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, Weekly epidemiological record 17(83): 145-54.
- [9] WHO. 2009, *Buruli ulcer meetings in Cotonou, Benin, 30 March-3 April 2009. Summary report*, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [10] WHO. 2015, *Investing to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases*, World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- [11] WHO. 2019, <http://www.who.int/buruli/en/>, abgerufen am 1.4.2019.
- [12] Huygen K, Adjei O, Affolabi D, Bretzel G, Demangel C, Fleischer B, Johnson RC, Pedrosa J, Phanzu DM, Phillips RO, Pluschke G, Siegmund V, Singh M, van der Werf TS, Wansbrough-Jones M, Portaels F. 2009, *Buruli ulcer disease: prospects for a vaccine*, Med Microbiol Immunol. 198(2): 69-77.
- [13] WHO. 2010, *Annual Meeting on Buruli Ulcer, 22-24 March 2010 Summary Report TAG Meeting*, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [14] WHO. 2018, *Global Health Observatory (GHO) data, WHO, Geneva, Switzerland*, http://www.who.int/gho/neglected_diseases/buruli_ulcer/en/ abgerufen am 12.04.2018.
- [15] Bretzel G, Beissner M. 2018, *PCR detection of Mycobacterium ulcerans-significance for clinical practice and epidemiology.*, Expert Rev Mol Diagn. 1:1-12..
- [16] Ohtsuka M, Kikuchi N, Yamamoto T, Suzutani T, Nakanaga K, Suzuki K, Ishii N. 2014, *Buruli ulcer caused by Mycobacterium ulcerans subsp shinshuense: a rare case of familial concurrent occurrence and detection of insertion sequence 2404 in Japan*, JAMA Dermatol. 150(1): 64-7.
- [17] Yotsu RR, Nakanaga K, Hoshino Y, Suzuki K, Ishii N. 2012, *Buruli ulcer and current situation in Japan: a new emerging cutaneous Mycobacterium infection*, J Dermatol. 39(7): 587-93.
- [18] Debacker M, Aguiar J, Steunou C, Zinsou C, Meyers WM, Scott JT, Dramaix M, Portaels F. 2004, *Mycobacterium ulcerans disease: role of age and gender in incidence and morbidity*, Trop Med Int Health. 9(12): 1297-304.

- [19] Bretzel G, Huber KL, Kobara B, Beissner M, Piten E, Herbinge KH, Wiedemann FX, Amekuse K, Banla Kere A, Helfrich K, Fleischmann E, Löscher T, Diefenhardt A, Nitschke J. 2011, *Laboratory confirmation of Buruli ulcer disease in Togo, 2007-2010*, PLoS Negl Trop Dis. 5(7): e1228.
- [20] Wansbrough-Jones M, Phillips R. 2006, *Buruli ulcer: emerging from obscurity*, Lancet. 367(9525): 1849-58.
- [21] Phanzu DM, Bafende EA, Dunda BK, Imposo DB, Kibadi AK, Nsiangana SZ, Singa JN, Meyers WM, Suykerbuyk P, Portaels F. 2006, *Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer) in a rural hospital in Bas-Congo, Democratic Republic of Congo, 2002-2004*, Am J Trop Med Hyg. 75(2): 311-4.
- [22] Quek TY, Athan E, Henry MJ, Pasco JA, Redden-Hoare J, Hughes A, Johnson PD. 2007, *Risk Factors for Mycobacterium ulcerans Infection, Southeastern Australia*, Emerg Infect Dis. 13(11): 1661-6.
- [23] WHO. 2014, *HIV/AIDS Fact sheet N°360*, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [24] Johnson RC, Nackers F, Glynn JR, de Biurrun Bakedano E, Zinsou C, Aguiar J, Tonglet R, Portaels F. 2008, *Association of HIV infection and Mycobacterium ulcerans disease in Benin*, AIDS. 22(7): 901-3.
- [25] Toll A, Gallardo F, Ferran M, Gilaberte M, Iglesias M, Gimeno JL, Rondini S, Pujol RM. 2005, *Aggressive multifocal Buruli ulcer with associated osteomyelitis in an HIV-positive patient*, Clin Exp Dermatol. 30(6): 649-51.
- [26] Christinet V, Comte E, Ciaffi L, Odermatt P, Serafini M, Antierens A, Rossel L, Nomo AB, Nkemenang P, Tsoungui A, Delhumeau C, Calmy A. 2014, *Impact of human immunodeficiency virus on the severity of buruli ulcer disease: results of a retrospective study in cameroon*, Open Forum Infect Dis.1(1): 021.
- [27] Amofah G, Bonsu F, Tetteh C, Okrah J, Asamoah K, Asiedu K, Addy J. 2002, *Buruli ulcer in Ghana: results of a national case search*, Emerg Infect Dis. 8(2): 167-70.
- [28] Sopoh GE, Barogui YT, Johnson RC, Dossou AD, Makoutodé M, Anagonou SY, Kestens L, Portaels F. 2010, *Family relationship, water contact and occurrence of Buruli ulcer in Benin*, PLoS Negl Trop Dis. 4(7): e746.
- [29] Williamson HR, Benbow ME, Nguyen KD, Beachboard DC, Kimbirauskas RK, McIntosh MD, Quaye C, Ampadu EO, Boakye D, Merritt RW, Small PL. 2008, *Distribution of Mycobacterium ulcerans in buruli ulcer endemic and non-endemic aquatic sites in Ghana*, PLoS Negl Trop Dis. 2(3): e205.
- [30] Landier J, Boisier P, Fotso Piam F, Noumen-Djeunga B, Simé J, Wantong FG, Marsollier L, Fontanet A, Eyangoh S. 2011, *Adequate wound care and use of bed nets as protective factors against Buruli Ulcer: results from a case control study in Cameroon.*, PLoS Negl Trop Dis. 5(11): e1392.
- [31] Ross BC, Johnson PD, Oppesidano F et al. 1997, *Detection of Mycobacterium ulcerans in environmental samples during an outbreak of ulcerative disease*, Appl Environ Microbiol.; 63 4135-4138.
- [32] Stinear T, Davies JK, Jenkin GA, Hayman JA Oppesidano F, Johnson PD. 2000, *Identification of Mycobacterium ulcerans in the environment from region in Southeast Australia in which it is endemic with sequence capture-PCR*, Appl Environ Microbiol.; 66; 3206-3213.
- [33] Bratschi MW, Ruf MV, Andreoli A, Minyem JC, Kerber S, Wantong FG, Pritchard J, Chakwera V, Beuret C, Wittwer M, Noumen D, Schürch N, Um Book A, Pluschke G. 2014, *Mycobacterium ulcerans persistence at a village water source of Buruli ulcer*

- patients, PLoS Negl Trop Dis. 8(3): e2756.
- [34] Maman I, Tchacondo T, Kere AB, Beissner M, Badziklou K, Tedihou E, Nyaku E, Amekuse K, Wiedemann FX, Karou DS, Bretzel G. 2018, *Molecular detection of Mycobacterium ulcerans in the environment and its relationship with Buruli ulcer occurrence in Zio and Yoto districts of maritime region in Togo*, PLoS Negl Trop Dis.;12(5):e0006455.
- [35] Fyfe JAM, Lavender CJ, Handasyde KA, Legione AR, O'Brien CR, et al. 2010, *A Major Role for Mammals in the Ecology of Mycobacterium ulcerans*, PLoS Negl Trop Dis. 4(8): e791.
- [36] Gryseels S, Amissah D, Durnez L, Vandellanoot K, Leirs H, et al. 2012, *Amoebae as Potential Environmental Hosts for Mycobacterium ulcerans and Other Mycobacteria, but Doubtful Actors in Buruli Ulcer Epidemiology*, PLoS Negl Trop Dis 6(8): e1764.
- [37] Bratschi MW, Bolz M, Minyem JC, Grize L, Wantong FG, et al. 2013, *Geographic Distribution, Age Pattern and Sites of Lesions in a Cohort of Buruli Ulcer Patients from the Mapé Basin of Cameroon*, PLoS Negl Trop Dis 7(6): e2252.
- [38] Williamson HR, Mosi L, Donnell R, Aqqad M, Merritt RW, Small PL. 2014, *Mycobacterium ulcerans fails to infect through skin abrasions in a guinea pig infection model: implications for transmission*, PLoS Negl Trop Dis. 8(4): e2770.
- [39] Carolan K, Ebong SM, Garchitorena A, Landier J, Sanhueza D, Texier G, Marsollier L, Gall PL, Guégan JF, Lo Seen D. 2014, *Ecological niche modelling of Hemipteran insects in Cameroon; the paradox of a vector-borne transmission for Mycobacterium ulcerans, the causative agent of Buruli ulcer*, Int J Health Geogr. 13: 44.
- [40] Yotsu R, Murase C, Sugawara M, Suzuki K, Nakanaga K, Ishii N, Asiedu K. 2015, *Revisiting Buruli ulcer*, J Dermatol.; 42(11):1033-41.
- [41] O'Brien CR, Handasyde KA, Hibble J, Lavender CJ, Legione AR, McCowan C, Globan M, Mitchell AT, McCracken HE, Johnson PD, Fyfe JA. 2014, *Clinical, microbiological and pathological findings of Mycobacterium ulcerans infection in three Australian Possum species*, PLoS Negl Trop Dis. 8(1): e2666.
- [42] Portaels F, Elsen P, Guimaraes-Peres A, Fonteyne PA, Meyers WM. 1999, *Insects in the transmission of Mycobacterium ulcerans infection*, The Lancet Vol. 353: 968.
- [43] Portaels F, Meyers WM, Ablordey A, Castro AG, Chemlal K, et al. 2008, *First Cultivation and Characterization of Mycobacterium ulcerans from the Environment*, PLoS Negl Trop Dis. 2(3): e178.
- [44] Johnson PDR, Hayman JA, Quek TY, Fyfe JAM, Jenkin GA, Buntine JA, Athan E, Birrell M, Graham J, Lavender CJ. 2007, *Consensus recommendations for the diagnosis, treatment and control of Mycobacterium ulcerans infection (Bairnsdale or Buruli ulcer) in Victoria, Australia*, MJA. 186 (2): 64-68.
- [45] Marion E, Eyangoh S, Yeramian E, Doannio J, Landier J, et al. 2010, *Seasonal and Regional Dynamics of M. ulcerans Transmission in Environmental Context: Deciphering the Role of Water Bugs as Hosts and Vectors*, PLoS Negl Trop Dis. 4(7): e731.
- [46] Johnson PD, Azuolas J, Lavender CJ, Wishart E, Stinear TP, Hayman JA, Brown L, Jenkin GA, Fyfe JA. 2007, *Mycobacterium ulcerans in mosquitoes captured during outbreak of Buruli ulcer, southeastern Australia*, Emerg Infect Dis. 13(11): 1653-60.
- [47] Luo Y, Degang Y, Ohtsuka M, Ishido Y, Ishii N, Suzuki K. 2015, *Detection of Mycobacterium ulcerans subsp. shinshuense DNA from a water channel in familial Buruli ulcer cases in Japan*, Future Microbiol.; 10; 461-469.

- [48] Eddyani M, Ofori-Adjei D, Teugels G et al. 2004, *Potential role for fish transmission of Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer)*, Appl Environ Microbiol.; 70; 5679-5681.
- [49] Sakaguchi K, Iima H, Hirayama K et al. 2011, *Mycobacterium ulcerans infection in an Indian flat-shelled turtle (Lissemys oungtata punctata)*, J Vet Med Sci.; 73; 1217-1220.
- [50] Marsollier L, Robert R, Aubry J, Saint André JP, Kouakou H, Legras P, Manceau AL, Mahaza C, Carbonnelle B. 2002, *Aquatic Insects as a Vector for Mycobacterium ulcerans*, Appl Environ Microbiol. 68(9): 4623-8.
- [51] Wallace JR, Mangas KM, Porter JL, Marcsisin R, Pidot SJ, Howden B, et al. 2017, *Mycobacterium ulcerans low infectious dose and mechanical transmission support insect bites and puncturing injuries in the spread of Buruli ulcer*, PLoS Negl Trop Dis 11(4): e0005553.
- [52] Rodhain F.2012, *L'ulcère de Buruli : hypothèses relatives au mode de transmission de Mycobacterium ulcerans*, Bull Acad Natl Med.196(3): 685-90, 690-1.
- [53] Meyers WM, Shelly WM, Connor DH, Meyers EK. 1974, *Human Mycobacterium ulcerans infections developing at sites of trauma to skin*, Am J Trop Med Hyg. 23(5): 919-23.
- [54] Merritt RW, Walker ED, Small PL, Wallace JR, Johnson PD, Benbow ME, Boakye DA. 2010, *Ecology and transmission of Buruli ulcer disease: a systematic review*, PLoS Negl Trop Dis. 4(12): e911.
- [55] Sugawara M, Ishii N, Nakanaa K et al. 2015, *Exploration of a standard treatment for Buruli ulcer through a comprehensive analysis of all cases diagnosed in Japan*, J Dermatol.; 42: 581–595.
- [56] Debacker M, Zinsou C, Aguiar J, Meyers WM, Portaels F. 2003, *First case of Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer) following a human bite*, Clin Infect Dis. 36(5): e67-8.
- [57] Exner K, Lemperle G. 1987, *Buruli-Ulkus—Nekrotisierende Infektion an der Hand eines Plastischen Chirurgen*, Handchir Mikrochir Plast Chir. 19: 230-32.
- [58] Bretzel G, Siegmund V, Racz P, van Vloten F, Ngos F, Thompson W, Bignon P, Adjei O, Fleischer B, Nitschke J. 2005, *Post-surgical assessment of excised tissue from patients with Buruli ulcer disease: progression of infection in macroscopically healthy tissue*, Trop Med Int Health. 10(11): 1199-206.
- [59] Beissner M, Arens N, Wiedemann F, Piten E, Kobara B, Bauer M, Herbinger KH, Badziklou K, Banla Kere A, Löscher T, Nitschke J, Bretzel G. 2015, *Treatment Outcome of Patients with Buruli Ulcer Disease in Togo*, PLoS Negl Trop Dis. 9(10): e0004170.
- [60] Bretzel G, Siegmund V, Nitschke J, Herbinger KH, Thompson W, Klutse E, Crofts K, Massavon W, Etuaful S, Thompson R, Asamoah-Opore K, Racz P, Vloten F, van Berberich C, Kruppa T, Ampadu E, Fleischer B, Adjei O. 2007, *A stepwise approach to the laboratory diagnosis of Buruli ulcer disease*, Trop Med Int Health. 12(1): 89-96.
- [61] WHO. 2012, *Treatment of Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer): Guidance for health workers*, WHO, Geneva, Switzerland.
- [62] Beissner M, Herbinger KH, Bretzel G. 2010, *Laboratory diagnosis of Buruli ulcer disease*, Future Microbiol. 5(3): 363-70.
- [63] Abdoulaye S, Hamdan KS, Isidore KY, Joseph EE, Mamadou K, Patrice GI. 2014, *Mycobacterium ulcerans Disease with Unusual Sites Not to Be Ignored*, Dermatol Res Pract.: 639374.

- [64] Pszolla N, Sarkar MR, Strecker W, Kern P, Kinzl L, Meyers WM, Portaels F. 2003, *Buruli ulcer: a systemic disease*, Clin Infect Dis. 37(6): e78-82.
- [65] Lagarrigue V, Portaels F, Meyers WM, Aguiar J. 2000, *L'ulcère de Buruli: attention aux atteintes osseuses! A propos de 33 cas observés au Bénin*, Med Trop (Mars). 60(3): 262-6.
- [66] Vincent QB, Ardant MF, Adeye A, Goundote A, Saint-André JP, Cottin J, Kempf M, Agossadou D, Johnson C, Abel L, Marsollier L, Chauty A, Alcaïs A. 2014, *Clinical epidemiology of laboratory-confirmed Buruli ulcer in Benin: a cohort study.*, Lancet Glob Health. 2(7): e422-30.
- [67] Pommelet V, Vincent QB, Ardant MF, Adeye A, Tanase A, Tondeur L, Rega A, Landier J, Marion E, Alcaïs A, Marsollier L, Fontanet A, Chauty A. 2014, *Findings in patients from Benin with osteomyelitis and polymerase chain reaction-confirmed Mycobacterium ulcerans infection*, Clin Infect Dis.; 59(9): 1256-64.
- [68] Hounbédji GM, Frenette J. 2011, *L'ulcère de Buruli - Au-delà de la nécrose cutanée, répercussions sur le tissu musculaire*, Med Sci Paris. 27(2):187-92.
- [69] Barogui Y, Johnson RC, van der Werf TS, Sopoh G, Dossou A, Dijkstra PU, Stienstra Y. 2009, *Functional limitations after surgical or antibiotic treatment for Buruli ulcer in Benin*, Am J Trop Med Hyg. 81(1): 82-7.
- [70] Sarfo FS, Thompson W, Phillips RO, Paintsil A, Abass MK, Frimpong M, Abotsi J, Asiedu K, Wansbrough-Jones MH. 2014, *A Severe Case of Buruli Ulcer Disease with Pleural Effusions*, PLoS Negl Trop Dis. 8(6): e2868.
- [71] WHO. 2001, *Diagnosis of Mycobacterium ulcerans disease*, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [72] Toutous Trelu L, Nkemenang P, Comte E, Ehounou G, Atangana P, Mboua DJ, Rusch B, Njih Tabah E, Etard JF, Mueller YK. 2016, *Differential Diagnosis of Skin Ulcers in a Mycobacterium ulcerans Endemic Area: Data from a Prospective Study in Cameroon*, PLoS Negl Trop Dis.10(4): e0004385.
- [73] Suerbaum S, Burchard GD, Kaufmann SHE, Schulz TF. 2016, *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer Verlag Berlin Heidelberg. 337-50.
- [74] Portaels F. 2001, *Buruli Ulcer - Diagnosis of Mycobacterium ulcerans disease*, WHO, Geneva, Switzerland.
- [75] Doig KD, Holt KE, Fyfe JA, Lavender CJ, Eddyani M, Portaels F, Yeboah-Manu D, Pluschke G, Seemann T, Stinear TP. 2012, *On the origin of Mycobacterium ulcerans, the causative agent of Buruli ulcer*, BMC Genomics. 13: 258.
- [76] Fol M, Olek J, Kowalewicz-Kulbat M, Druszczńska M, Rudnicka W. 2011, *Prątki niegruźlicze: M. marinum, M. ulcerans, M. xenopi – krótka charakterystyka drobnoustrojów i zmian klinicznych przez nie wywoływanych*, Postepy Hig Med Dosw. 65: 574-83.
- [77] Pidot SJ, Asiedu K, Käser M, Fyfe JA, Stinear TP. 2010, *Mycobacterium ulcerans and other mycolactone-producing mycobacteria should be considered a single species*, PLoS Negl Trop Dis. 4(7): e663.
- [78] Stinear T, Ross BC, Davies JK, Marino L, Robins-Browne RM, Oppedisano F, Sievers A, Johnson PD. 1999, *Identification and characterization of IS2404 and IS2606: two distinct repeated sequences for detection of Mycobacterium ulcerans by PCR.*, J Clin Microbiol. 37(4): 1018-23.
- [79] Munk K. 2008, *Lehrbuch Biologie: Mikrobiologie*, Thieme, Stuttgart, ISBN 978-3-13-144861-3. 238-239.

- [80] George KM, Pascopella L, Welty DM, Small PL. 2000, A *Mycobacterium ulcerans* toxin, mycolactone, causes apoptosis in guinea pig ulcers and tissue culture cells, *Infect Immun.* 68(2): 877-83.
- [81] Dobos KM, Small PL, Deslauriers M, Quinn FD, King CH. 2001, *Mycobacterium ulcerans* cytotoxicity in an adipose cell model, *Infect Immun.* 69(11): 7182-6.
- [82] Sarfo FS, Phillips RO, Rangers B, Mahrous EA, Lee RE, Tarelli E, Asiedu KB, Small PL, Wansbrough-Jones MH. 2010, *Detection of Mycolactone A/B in Mycobacterium ulcerans-Infected Human Tissue*, *PLoS Negl Trop Dis.* 4(1): e577.
- [83] Sarfo FS, Converse PJ, Almeida DV, Zhang J, Robinson C, Wansbrough-Jones M, Grosset JH. 2013, *Microbiological, histological, immunological, and toxin response to antibiotic treatment in the mouse model of Mycobacterium ulcerans disease.*, *PLoS Negl Trop Dis.* 7(3): e2101.
- [84] Stinear TP, Pryor MJ, Porter JL, Cole ST. 2005, *Functional analysis and annotation of the virulence plasmid pMUM001 from Mycobacterium ulcerans*, *Microbiology.*; 151; 683-692.
- [85] Coutanceau E, Decalf J, Martino A, Babon A, Winter N, Cole ST, Albert ML, Demangel C. 2007, *Selective suppression of dendritic cell functions by Mycobacterium ulcerans toxin mycolactone*, *J Exp Med.* 204(6):1395-403.
- [86] Phillips RO, Sarfo FS, Landier J, Oldenburg R, Frimpong M, Wansbrough-Jones M, Abass K, Thompson W, Forson M, Fontanet A, Niang F, Demangel C. 2014, *Combined inflammatory and metabolic defects reflected by reduced serum protein levels in patients with Buruli ulcer disease*, *PLoS Negl Trop Dis.* 8(4): e2786.
- [87] Hall BS, Hill K, McKenna M, Ogbuchi J, High S, Willis AE, Simmonds RE. 2014, *The pathogenic mechanism of the Mycobacterium ulcerans virulence factor, mycolactone, depends on blockade of protein translocation into the ER*, *PLoS Pathog.* 10(4): e1004061.
- [88] Pahlevan AA, Wright DJ, Andrews C, George KM, Small PL, Foxwell BM. 1999, *The inhibitory action of Mycobacterium ulcerans soluble factor on monocyte/T cell cytokine production and NF-kappa B function*, *J Immunol.* 63(7): 3928-35.
- [89] WHO. 2013, *Report of a WHO-FIND consultative meeting on diagnostics for Buruli ulcer*, WHO, Geneva, Switzerland.
- [90] Phillips R, Sarfo FS, Guenin-Macé L, Decalf J, Wansbrough-Jones M, Albert ML, Demangel C. 2009, *Immunosuppressive signature of cutaneous Mycobacterium ulcerans infection in the peripheral blood of patients with buruli ulcer disease*, *J Infect Dis.* 200(11): 1675-84.
- [91] Wadagni A, Frimpong M, Phanzu DM, Ablordey A, Kacou E, Gbedevi M, Marion E, Xing Y, Babu VS, Phillips RO, Wansbrough-Jones M, Kishi Y, Asiedu K. 2015, *Simple, Rapid Mycobacterium ulcerans Disease Diagnosis from Clinical Samples by Fluorescence of Mycolactone on Thin Layer Chromatography*, *PLoS Negl Trop Dis.* 9(11): e0004247.
- [92] Sarfo FS, Phillips R, Wansbrough-Jones M, Simmonds RE. 2016, *Recent advances: role of mycolactone in the pathogenesis and monitoring of Mycobacterium ulcerans infection/Buruli ulcer disease.*, *Cell Microbiol.* 18(1): 17-29.
- [93] Portaels F, WHO. 2014, *Laboratory diagnosis of buruli ulcer: a manual for health care providers*, WHO, Geneva, Switzerland.
- [94] WHO. 2010, *Guidance on sampling techniques for laboratory-confirmation of Mycobacterium ulcerans infection (Buruli ulcer disease)*, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

- [95] Bretzel G, Siegmund V, Nitschke J, Herbinger KH, Thompson R, Fleischmann E, Fleischer B, Adjei O. 2006, *External quality assurance for the laboratory diagnosis of Buruli ulcer disease in Ghana*, Trop Med Int Health. 11(11):1688-93.
- [96] Sizaire V, Nackers F, Comte E, Portaels F. 2006, *Mycobacterium ulcerans infection: control, diagnosis, and treatment*, Lancet Infect Dis. 6(5): 288-96.
- [97] Herbinger KH, Adjei O, Awua-Boateng NY, Nienhuis WA, Kunaa L, Siegmund V, Nitschke J, Thompson W, Klutse E, Agbenorku P, Schipf A, Reu S, Racz P, Fleischer B, Beissner M, Fleischmann E, Helfrich K, van der Werf TS, Löscher T, Bretzel G. 2009, *Comparative study of the sensitivity of different diagnostic methods for the laboratory diagnosis of Buruli ulcer disease*, Clin Infect Dis. 48(8):1055-64.
- [98] N'Guessan K, Kouassi Y, Bouzid S, Ehuie P, Koffi K, Oniangue C, Aka N, Dosso M. 2001, *Intérêt et limites de la microscopie des exsudats au cours de l'infection cutanée à Mycobacterium ulcerans en Côte d'Ivoire*, Bull Soc Pathol Exot. 94(1): 9-10.
- [99] Eddyani M, Debacker M, Martin A, Aguiar J, Johnson CR, Uwizeye C, Fissette K, Portaels F. 2008, *Primary culture of Mycobacterium ulcerans from human tissue specimens after storage in semisolid transport medium*, J Clin Microbiol. 46(1): 69-72.
- [100] Fyfe JA, Lavender CJ, Johnson PD, Globan M, Sievers A, Azuolas J, Stinear TP. 2007, *Development and application of two multiplex real-time PCR assays for the detection of Mycobacterium ulcerans in clinical and environmental samples*, Appl Environ Microbiol. 73(15): 4733-40.
- [101] Beissner M, Huber KL, Badziklou K, Halatoko WA, Maman I, Vogel F, Bidjada B, Awoussi KS, Piten E, Helfrich K, Mengele C, Nitschke J, Amekuse K, Wiedemann FX, Diefenhardt A, Kobara B, Herbinger KH, Kere AB, Prince-David M, Löscher T, Bretzel G. 2013, *Implementation of a national reference laboratory for Buruli ulcer disease in Togo*, PLoS Negl Trop Dis. 7(1): e2011.
- [102] Siegmund V, Adjei O, Racz P, Berberich C, Klutse E, van Vloten F, Kruppa T, Fleischer B, Bretzel G. 2005, *Dry-reagent-based PCR as a novel tool for laboratory confirmation of clinically diagnosed Mycobacterium ulcerans-associated disease in areas in the tropics where M. ulcerans is endemic*, J Clin Microbiol. 43(1): 271-6.
- [103] Siegmund V, Adjei O, Nitschke J, Thompson W, Klutse E, Herbinger KH, Thompson R, van Vloten F, Racz P, Fleischer B, Loescher T, Bretzel G. 2007, *Dry reagent-based polymerase chain reaction compared with other laboratory methods available for the diagnosis of Buruli ulcer disease*, Clin Infect Dis. 45(1): 68-75.
- [104] Rondini S, Mensah-Quainoo E, Troll H, Bodmer T, Pluschke G. 2003, *Development and application of real-time PCR assay for quantification of Mycobacterium ulcerans DNA*, J Clin Microbiol. 41(9): 4231-7.
- [105] O'Brien DP, Robson M, Friedman ND, Walton A, McDonald A, Callan P, Hughes A, Rahdon R, Athan E. 2013, *Incidence, clinical spectrum, diagnostic features, treatment and predictors of paradoxical reactions during antibiotic treatment of Mycobacterium ulcerans infections*, BMC Infect Dis. 13: 416.
- [106] Smith PG, Revill WDL, Lukwago E, Rykushin YP. 1976, *The protective effect of BCG against Mycobacterium ulcerans disease: a controlled trial in an endemic area of Uganda*, Trans R Soc Trop Med Hyg. 70: 449-457.
- [107] Portaels F, Aguiar J, Debacker M, Steunou C, Zinsou C, Guédénon A, Meyers WM. 2002, *Prophylactic effect of mycobacterium bovis BCG vaccination against osteomyelitis in children with Mycobacterium ulcerans disease (Buruli Ulcer)*, Clin Diagn Lab Immunol. 9(6):1389-91.
- [108] Portaels F, Aguiar J, Debacker M, Guédénon A, Steunou C, Zinsou C, Meyers WM.

- 2004, *Mycobacterium bovis BCG vaccination as prophylaxis against Mycobacterium ulcerans osteomyelitis in Buruli ulcer disease*, *Infect Immun.* 72(1): 62-5.
- [109] Phillips RO, Phanzu DM, Beissner M, Badziklou K, Luzolo EK, Sarfo FS, Halatoko WA, Amoako Y, Frimpong M, Kabiru AM, Piten E, Maman I, Bidjada B, Koba A, Awoussi KS, Kobara B, Nitschke J, Wiedemann FX, Kere AB, Adjei O, Löscher T, Bretzel G. 2015, *Effectiveness of routine BCG vaccination on buruli ulcer disease: a case-control study in the Democratic Republic of Congo, Ghana and Togo*, *PLoS Negl Trop Dis.* 9(1): e3457.
- [110] Etuaful S, Carbonnelle B, Grosset J, Lucas S, Horsfield C, Phillips R, Evans M, Ofori-Adjei D, Klustse E, Owusu-Boateng J, Amedofu GK, Awuah P, Ampadu E, Amofah G, Asiedu K, Wansbrough-Jones M. 2005, *Efficacy of the combination rifampin-streptomycin in preventing growth of Mycobacterium ulcerans in early lesions of Buruli ulcer in humans*, *Antimicrob Agents Chemother.* 49(8): 3182-6.
- [111] Chauty A, Ardant MF, Adeye A, Euverte H, Guédénon A, Johnson C, Aubry J, Nuermberger E, Grosset J. 2007, *Promising clinical efficacy of streptomycin-rifampin combination for treatment of buruli ulcer (Mycobacterium ulcerans disease)*, *Antimicrob Agents Chemother.* 51(11): 4029-35.
- [112] Phillips RO, Sarfo FS, Abass MK, Abotsi J, Wilson T, Forson M, Amoako YA, Thompson W, Asiedu K, Wansbrough-Jones M. 2014, *Clinical and bacteriological efficacy of rifampin-streptomycin combination for two weeks followed by rifampin and clarithromycin for six weeks for treatment of Mycobacterium ulcerans disease*, *Antimicrob Agents Chemother.* 58(2): 1161-6.
- [113] Nienhuis WA, Stienstra Y, Thompson WA, Awuah PC, Abass KM, Tuah W, Awuah-Boateng NY, Ampadu EO, Siegmund V, Schouten JP, Adjei O, Bretzel G, van der Werf TS. 2010, *Antimicrobial treatment for early, limited Mycobacterium ulcerans infection: a randomised controlled trial*, *Lancet.* 375(9715): 664-72.
- [114] Chauty A, Ardant MF, Marsollier L, Pluschke G, Landier J, Adeye A, Goundoté A, Cottin J, Ladikpo T, Ruf T, Ji B. 2011, *Oral treatment for Mycobacterium ulcerans infection: results from a pilot study in Benin*, *Clin Infect Dis.* 52(1): 94-6.
- [115] Wansbrough-Jones M. 2017, *Report from the Meeting of the Buruli ulcer Technical Advisory Group, 21 March 2017*, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [116] Marsollier L, Honoré N, Legras P, Manceau AL, Kouakou H, Carbonnelle B, Cole ST. 2003, *Isolation of three Mycobacterium ulcerans strains resistant to rifampin after experimental chemotherapy of mice*, *Antimicrob Agents Chemother.* 47(4):1228-32.
- [117] Nienhuis WA, Stienstra Y, Abass KM, Tuah W, Thompson WA, Awuah PC, Awuah-Boateng NY, Adjei O, Bretzel G, Schouten JP, van der Werf TS. 2012, *Paradoxical responses after start of antimicrobial treatment in Mycobacterium ulcerans infection*, *Clin Infect Dis.* 54(4): 519-26.
- [118] Beissner M, Piten E, Maman I, Symanck D, Jansson M, Nitschke J, Amekuse K, Kobara B, Wiedemann F, Hoffmann H, Diefenhardt A, Badziklou K, Banla Kere A, Löscher T, Bretzel G. 2012, *Spontaneous clearance of a secondary Buruli ulcer lesion emerging ten months after completion of chemotherapy--a case report from Togo*, *PLoS Negl Trop Dis.* 6(7): e1747.
- [119] Ruf MT, Chauty A, Adeye A, Ardant MF, Kousse mou H, Johnson RC, Pluschke G. 2011, *Secondary Buruli ulcer skin lesions emerging several months after completion of chemotherapy: paradoxical reaction or evidence for immune protection?*, *PLoS Negl Trop Dis.* 5(8): e1252.
- [120] O'Brien DP, Robson ME, Callan PP, McDonald AH. 2009, *"Paradoxical" immune-*

- mediated reactions to Mycobacterium ulcerans during antibiotic treatment: a result of treatment success, not failure*, Med J Aust. 191(10): 564-6.
- [121] Beissner M, Awua-Boateng NY, Thompson W, Nienhuis WA, Klutse E, Agbenorku P, Nitschke J, Herbinger KH, Siegmund V, Fleischmann E, Adjei O, Fleischer B, van der Werf TS, Loscher T, Bretzel G. 2010, *A genotypic approach for detection, identification, and characterization of drug resistance in Mycobacterium ulcerans in clinical samples and isolates from Ghana.*, Am J Trop Med Hyg.; 83(5): 1059-65.
- [122] Jansson M, Beissner M, Phillips RO, Badziklou K, Piten E, Maman I, Sarfo FS, Huber KL, Rhomberg A, Symank D, Wagner M, Wiedemann F, Nitschke J, Banla Kere A, Herbinger KH, Adjei O, Löscher T, Bretzel G. 2014, *Comparison of two assays for molecular determination of rifampin resistance in clinical samples from patients with Buruli ulcer disease*, J Clin Microbiol. 52(4):1246-9.
- [123] Sarpong-Duah M, Frimpong M, Beissner M, Saar M, Laing K, Sarpong F, Loglo AD, Abass KM, Frempong M, Sarfo FS, Bretzel G, Wansbrough-Jones M, Phillips RO. 2017, *Clearance of viable Mycobacterium ulcerans from Buruli ulcer lesions during antibiotic treatment as determined by combined 16S rRNA reverse transcriptase /IS 2404 qPCR assay*, PLoS Negl Trop Dis 11(7): e0005695.
- [124] Cubero N, Esteban J, Palenque E, Rosell A, Garcia MJ. 2013, *Evaluation of the detection of Mycobacterium tuberculosis with metabolic activity in culture-negative human clinical samples*, Clin Microbiol Infect. 19(3): 273-8.
- [125] Desjardin LE. 2001, *Isolation of M. tuberculosis RNA from Sputum*, Methods Mol Med. 48: 133-9.
- [126] Hellyer TJ, DesJardin LE, Hehman GL, Cave MD, Eisenach KD. 1999, *Quantitative analysis of mRNA as a marker for viability of Mycobacterium tuberculosis*, J Clin Microbiol. 37(2): 290-5.
- [127] Desjardin LE, Perkins MD, Wolski K, Haun S, Teixeira L, Chen Y, Johnson JL, Ellner JJ, Dietze R, Bates J, Cave MD, Eisenach KD. 1999, *Measurement of sputum Mycobacterium tuberculosis messenger RNA as a surrogate for response to chemotherapy*, Am J Respir Crit Care Med. 160(1): 203-10.
- [128] Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, Williams DL. 2009, *Molecular determination of Mycobacterium leprae viability by use of real-time PCR*, J Clin Microbiol. 47(7): 2124-30.
- [129] Martinez AN, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Moraes MO. 2011, *Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of Mycobacterium leprae DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy*, PLoS Negl Trop Dis. 5(10): e1354.
- [130] Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. 2009, *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*, Clin Chem. 55(4): 611-22.
- [131] Altman DG, Bland JM. 1994, *Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity*, BMJ.; 308(6943): 1552.
- [132] Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012, *Primer3 - new capabilities and interfaces*, Nucleic Acids Research. 40(15): e115.
- [133] Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. 1997, *Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification*, Biotechniques; 22:130-8.
- [134] Talaat AM, Howard ST, Hale W 4th, Lyons R, Garner H, Johnston SA. 2002, *Genomic DNA standards for gene expression profiling in Mycobacterium tuberculosis*, Nucleic

Acids Res. 30(20): e104.

- [135] Beissner M, Symank D, Phillips RO, Amoako YA, Awua-Boateng NY, Sarfo FS, Jansson M, Huber KL, Herbinger KH, Battke F, Löscher T, Adjei O, Bretzel G. 2012, *Detection of viable Mycobacterium ulcerans in clinical samples by a novel combined 16S rRNA reverse transcriptase/IS2404 real-time qPCR assay*, PLoS Negl Trop Dis. 6(8): e1756.
- [136] Allen ChA, Payne SL, Harville M, Cohen N, Russel KE. 2007, *Validation of Quantitative Polymerase Chain Reaction Assays for Measuring Cytokine Expression in Equine Macrophages*, J Immunol Methods. 328(1-2): 59-69.
- [137] Davis GL, Ray NA, Lahiri R, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Williams DL, Adams LB. 2013, *Molecular assays for determining Mycobacterium leprae viability in tissues of experimentally infected mice.*, PLoS Negl Trop Dis. 7(8): e2404.
- [138] Sarpong-Duah M, Frimpong M, Beissner M, Laing K, Naana-Sarpong F, Loglo D, Kunaa L, Abass Kabiru M, Sarfo FS, Bretzel G, Wansbrough-Jones M, Phillips R. 2014, *[Abstract] Rate of clearance of Mycobacterium ulcerans during antibiotic therapy: New insights for optimizing treatment*, WHO Meeting, Geneva, Switzerland.

8. Danksagungen

Frau Prof. Dr. Gisela Bretzel danke ich herzlich für die Überlassung des Themas meiner Dissertation, für die Aufnahme in die Buruli Ulkus Arbeitsgruppe und die kontinuierliche, engagierte wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung die ich durch sie erfahren habe.

Herrn Dr. Marcus Beißner danke ich ganz besonders für seine Hilfe bei der Einarbeitung und Heranführung an die Thematik, die unermüdliche Unterstützung und wissenschaftliche Beratung in allen Aspekten dieser Dissertation. Vielen lieben Dank!

Ich bedanke mich sehr bei Herrn Prof. Dr. T. Löscher und Herrn Prof. Dr. Hölscher für ihr Interesse an Entwicklung und Fortgang des Projekts sowie ihre Gesprächsbereitschaft in dessen Verlauf. Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Herbinger danke ich vielmals für die hervorragende Unterstützung in allen statistischen Fragestellungen.

Ich bedanke mich bei allen technischen Assistentinnen, insbesondere bei Frau Kerstin Helfrich, Frau Carolin Mengele und Frau Erna Fleischmann, für die sehr nette und hilfreiche Einarbeitung im Labor.

Ein besonders herzlicher Dank geht auch an meine Mutter und meinen Vater, sowie meine Geschwister und meine Frau Sarah, die mich in meinem Projekt stets unterstützt haben!

9. Anhang

1. Ethikvotum



KWAME NKUMAH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
COLLEGE OF HEALTH SCIENCES
SCHOOL OF MEDICAL SCIENCES
COMMITTEE ON HUMAN RESEARCH PUBLICATION AND ETHICS

Our Ref: CHRPE/28/09

June 18, 2009

Prof. Ohene Adjei
KCCR
KNUST, Kumasi

Dear Sir,

LETTER OF APPROVAL

Protocol Title: *"Application of Molecular Tools in the Clinical Management of Buruli Ulcer Disease"*

Your submission to the Committee on Human Research, Publications and Ethics on the above named protocol refers.

The Committee has considered the ethical merit of your submission and approved the protocol.

The Committee wishes to state however, that samples and/or data gathered for the study should be used for the study purposes only.

It is also required that permission should be sought from the committee if any amendment is made to the protocol.

The Committee would expect a periodic report on your study, annually or at close of the project, whichever one comes first. It should also be informed of any publications arising from the study.

Many thanks for your application.

Yours faithfully,

Prof. Sir JW Acheampong, MD, FWACP
Chairman

2. Protokolle für die Herstellung des PANTA-Transportmediums und des LTM Transportmediums

| | | |
|--|--------------------|---|
|  | Protocol S1 |  |
| Preparation of PANTA transport medium and stabilisation of <i>M. ulcerans</i> RNA/DNA in swab samples and culture suspensions | | |
| DITM (LMU), KATH and KCCR (KNUST) | | v1 03.01.2012 |

1. General considerations

This document describes the standard operating procedure for the preparation of PANTA transport medium for viable *M. ulcerans* in clinical samples and stabilisation of swab samples and culture suspensions for combined mycobacterial RNA/DNA extraction in two steps:

- 1) Preparation of PANTA transport medium for swab samples
- 2) Stabilisation of *M. ulcerans* from culture or swab samples for RNA/DNA extraction

▲ = Note!

2. Reagents, material and instruments

2.1 PANTA transport medium

- Dubos Broth Base, 500g (BD, Heidelberg, Germany, ref# 238510)
- Dubos Medium Albumin, 12x20 ml (BD, ref# 230910)
- BBL MGIT PANTA, 6 pcs. (BD, ref# 245114)
- Glycerol (1,2,3-Propantriol), 99.5% p.a., 1L (e.g. Roth, Karlsruhe, Germany, ref# 3783.1)
- H₂O, 1L
- 2 ml certified RNase/DNase free screw cap tube (Sarstedt, Nümbrecht, Germany, ref# 72.694.100)
- Rack for tubes, sterile 1L sterile glass bottle, Laminar Flow cabinet

2.2 Stabilisation of swab samples for RNA/DNA extraction

- Medical swab, 165 mm, cotton/wood, sterile (Milan, Basel, Switzerland, ref# EBC-150)
- 2 ml tubes with 500 µl PANTA (alternatively LTM)
- RNA Protect Bacteria reagent, 2x100ml (Qiagen, Hilden, Germany, ref# 76506)
- Biosafety cabinet class II
- Centrifuge
- Thermomixer
- Freezer (-20°C/-70°C)

3. Preparation of PANTA transport medium

▲ **Work under sterile conditions in a laminar Flow!**

- 1) Distil 850 ml water and filter through sterile bottle top filter.
- 2) Filter glycerol through sterile bottle top filter (this will take a while due to the consistency).

▲ **Glycerol is heat labile!**

- 3) Dissolve 1.5 g Dubos Broth Base in 204 ml distilled water and autoclave for 15 min. at 121°C. Allow the solution to cool down to approx. 50°C before adding 12 ml of filtered glycerol and 24 ml Dubos Medium Albumin.
- 4) Dissolve 2 vials of BBL MGIT PANTA (Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixic acid, Trimethoprim, Azlocillin) in 3 ml filtered distilled water each to obtain PANTA antibiotic mixture.
- 5) For the preparation of PANTA transport medium add 6 ml of PANTA antibiotic mixture to the autoclaved Dubos Broth Base/glycerol mixture under sterile conditions.
- 6) To check sterility add 1 ml PANTA transport medium under sterile conditions to two 2 ml screw cap tubes each and incubate at 36°C for 24h (tube 1) and 1 week (tube 2) respectively. A clear medium indicates sterility while a turbid medium indicates contamination with bacteria (tube 1) and/or fungi

(tube 2). In case of contamination discard the medium and prepare a new batch PANTA transport medium before use.

Store the medium at 4-8°C for max. 3 months in a sterile glass bottle labelled “PANTA transport medium” with the date of preparation. Aliquot 500 µl PANTA transport medium in 2 ml screw cap tubes labelled “PANTA” under sterile conditions.

▲ *Alternatively Liquid Transport Medium (LTM)¹ can be used if routinely applied for cultures in the respective laboratory.*

4. Stabilisation of swab samples for RNA/DNA extraction

4.1.a. Stabilization of swab samples

1a) Collect swab(s) from BUD suspected lesions by circling the entire undermined edge of the ulcer according to routine procedure.

2a) Store swab stick in 2 ml tubes containing 500µl PANTA transport medium (alternatively 500µl LTM)

▲ *The swab can be transported at ambient temperature and may be stored for up to 4 weeks at 4°C, however it is recommended to apply the following steps directly upon arrival of clinical samples at the laboratory!*

▲ Work in a biosafety cabinet class II

3a) Add 1 ml RNA Protect Bacteria reagent to each swab sample in 500 µl PANTA transport medium (2:1), vortex vigorously for 10 sec.

4a) Incubate specimens for 5 min. at ambient temperature, vortex every minute for 10 sec.

5a) Inactivate samples at 95°C for 10 min., incubate on ice for 5 min.

6a) Pellet material by centrifugation at 5000g at ambient temperature for 5 min., remove swab stick carefully and discard supernatant, keep samples on ice and continue RNA/DNA extraction with pellet (see protocol S2) or freeze pellets at -20°C for up to 1 month (alternatively at -70°C for up to 12 months).

4.1.b. Stabilization of culture suspension

1b) Add 1 ml RNA Protect Bacteria reagent to tubes containing 500 µl PANTA transport medium.

▲ Work in a biosafety cabinet class II

2b) Suspend one loop-full of *M. ulcerans* culture material in the mixture from step 1).

3b) Vortex vigorously for 10 sec.

4b) Incubate suspension at ambient temperature for 5 min., vortex every minute for 10 sec.

5b) Inactivate suspensions at 95°C for 5 min., incubate on ice for 5 min.

6b) Pellet material by centrifugation at 5000g at ambient temperature for 5 min., discard supernatant, keep samples on ice and continue RNA/DNA extraction with pellet (see protocol S2) or freeze pellets at -20°C for up to 1 month (alternatively at -70°C for up to 12 months).

¹Fine-Needle Aspiration, an Efficient Sampling Technique for Bacteriological Diagnosis of Nontulcerative Buruli Ulcer (2009) Eddyani M, Fraga AG, Schmitt F, Uwizeye C, et al. J Clin Microbiol. 2009 June; 47(6): 1700–1704.

| | |
|---|---------------|
|   | Protocol S1a) |
| Preparation of LTM liquid transport medium | |
| DITM (LMU) | 01.11.2011 |

1. General considerations

This document describes the standard operating procedure for the preparation of LTM transport medium for viable *M. ulcerans* in clinical samples.

▲ = **Note !**

2. Preparation of LTM liquid transport medium

2.1 Reagents & Material

- Difco Middlebrook 7H9 Broth, 500g (BD, Heidelberg, Germany)
- Bacto Casitone (BD)
- BBL Middlebrook OADC Enrichment (BD)
- BBL MGIT PANTA, 6 pcs. (BD)
- H₂O, 1L
- 2 ml RNase/DNase free screw cap tube (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)
- Rack for tubes, sterile 1L glass bottle, Laminar Flow cabinet

2.2. Preparation

▲ **Work under sterile conditions in a laminar Flow!**

- 1) Distil 180 ml water and filter through sterile bottle top filter.
- 2) Dissolve 1.3 g Difco Middlebrook 7H9 Broth in 180 ml distilled water and autoclave for 15 min. at 121°C. Allow the solution to cool down to approx. 50°C before adding 20ml BBL Middlebrook OADC Enrichment.
- 3) Dissolve 2 vials of BBL MGIT PANTA (Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixic acid, Trimethoprim, Azlocillin) in 3 ml filtered distilled water each to obtain PANTA antibiotic mixture.
- 4) For the preparation of LTM liquid transport medium add 5 ml of PANTA antibiotic mixture to the autoclaved Difco Broth/OADC mixture under sterile conditions.
- 5) To check sterility add 1 ml LTM liquid transport medium (under sterile conditions) in two 2 ml screw cap tube and incubate at 36°C for 24h (tube 1) and 1 week (tube 2) respectively. A clear medium indicates sterility while a turbid medium indicates contamination with bacteria (tube 1) or fungi (tube 2). In case of contamination prepare a new LTM liquid transport medium.

Store the medium in a sterile glass bottle labelled with „LTM liquid transport medium“ and the date of preparation at 4-8°C for max. 3 months. Aliquot 500 µl LTM liquid transport medium in 2 ml screw cap tubes labelled with “LTM”.

3. Protokoll DNA-/RNA-Extraktion

| | | |
|---|--------------------|---|
|  | Protocol S2 |  |
| Simultaneous RNA/DNA extraction from swab samples and reverse transcription of whole transcriptome RNA from <i>M. ulcerans</i> | | |
| DITM (LMU), KATH and KCCR (KNUST) | | v1 03.01.2012 |

1. General considerations

This document describes the standard operating procedure for simultaneous extraction of whole genome DNA and whole transcriptome RNA (incl. reverse transcription to cDNA) of *M. ulcerans* from clinical swab samples in two steps:

- 1) Simultaneous RNA/DNA extraction from *M. ulcerans*
- 2) Reverse transcription of *M. ulcerans* whole transcriptome RNA to cDNA

Follow all general precautions for RNA works and do not process more than 6-8 samples within one extraction procedure to adhere to quick processing of samples!

▲ = Note!

2. Material, reagents and instruments

2.1 Simultaneous RNA/DNA extraction from *M. ulcerans*

- AllPrep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany, ref# 80284)
- Cell lysis solution (CLS), 125 ml (Qiagen, ref# 158906)
- Proteinase K (>600 mAU/ml, solution), 2 ml (Qiagen, ref# 19131)
- Lysozyme, 1g (AppliChem, Darmstadt, Germany, ref# A4972,0001)
- Beta-(2)-Mercaptoethanol, 25 ml (AppliChem, ref# A1108,0025)
- Ethanol 96%, p.a., 500 ml (AppliChem, ref# A1615,0500GL)
- RNase Away, 2.5 L (Roth, Darmstadt, Germany, ref# A998.1)
- DEPC (Diethylpyrocarbonate) treated water, 1L (Roth, ref# T143.3)
- Reaction tubes, 1.5 ml, certified DNase/RNase free (Kisker, Steinfurt, Germany)
- 10 µl, 100 µl, 1000µl pipette filter tips, certified DNase/RNase free (Kisker)
- Syringes, sterile, 0.5 ml (Braun, Melsungen Germany)
- 21 Gauge needles, sterile (Braun)
- Sharps container
- Disposable gloves, nitrile, non-sterile
- Small ice container, crushed ice
- Tube rack, centrifuge, thermomixer, Laminar Flow, Fume hood, Vortex

2.2 Reverse transcription of *M. ulcerans* whole transcriptome RNA to cDNA

- QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, ref# 205311)
- Reaction tubes, 0.2 ml, certified DNase/RNase free (Kisker, ref# GS001F)
- Reaction tubes, 1.5 ml, certified DNase/RNase free (Kisker)
- 10 µl pipette filter tips, certified DNase/RNase free (Kisker)
- 0.5-10 µl Pipette
- Thermomixers
- Small ice container, crushed ice

3. Simultaneous RNA/DNA extraction from *M. ulcerans*

3.1. Preparations

▲ *All steps are conducted at ambient temperature (AT) if not explicitly indicated otherwise. Work quickly, but carefully! Perform centrifugation at 20 - 25° C, do not cool centrifuge below 20°C! Follow all general precautions for working with RNA! Wear gloves at all times and change them frequently! Clean the working space with RNase Away before getting started.*

The AllPrep DNA/RNA Micro Kit contains:

Buffers: RLT Plus, RPE, RW1, AW1, AW2, EB and RNase free water

DNA and RNeasy spin columns, collection tubes and 1.5 ml reaction tubes

Before using the AllPrep DNA/RNA Micro Kit for the first time:

I) Add ethanol 96%: 44 ml to Buffer RPE, 25 ml to Buffer AW1 and 30 ml to Buffer AW2.

II) Prepare 30 ml ethanol 80% by adding 5 ml DEPC treated water to 25 ml ethanol 96%.

III) Prepare 48 ml ethanol 70% by adding 13 ml DEPC treated water to 35 ml ethanol 96%.

IV) Generate 15 mg/ml CLS+L (CLS with lysozyme) buffer by adding 15mg lysozyme per ml CLS buffer, store at -20°C for up to 6 months.

General preparation prior to each extraction:

A) ▲ *Use a fume hood and wear nitrile gloves!*

Add **3.5µl x n** (n = no. of samples processed) **β-Mercaptoethanol** (β-ME) to **350µl x n Buffer RLT Plus**. Buffer RLT Plus containing β-ME is stable at room temperature for up to one month.

B) Clean all work surfaces with RNase Away reagent.

C) To prepare RNase-free syringes and needles pass DEPC-treated water through entire syringe and discard DEPC-treated water.

D) Label DNA spin columns & collection tubes.

E) Label RNeasy spin columns.

F) Prepare crushed ice in a reaction tube container.

3.2 Lysis

1) If applicable thaw frozen pellets on ice.

2) Add 100µl CLS+L Buffer and 20µl Proteinase K to each pellet on ice, vortex for 15 sec.

3) Incubate 5 min at AT, vortex 15 sec every minute.

4) Incubate 5 min at 45°C in thermomixer at high speed.

5) Add 350µl Buffer RLT Plus (containing β-ME) under fume hood, vortex vigorously for 15 sec.

6) Homogenise lysate by slowly (to avoid foaming!) passing it 5 times through the DEPC-treated 0.9 mm needle with syringe.

7) Transfer homogenized lysate from the syringe directly into labelled AllPrep DNA spin columns in a labelled 2 ml collection tube.

8) Centrifuge at 9000 g for 30 sec at AT, check if all liquid has passed through membrane, if not: repeat this step.

9) Transfer flow-through in collection tubes immediately on ice for subsequent RNA purification (3.3). Place AllPrep DNA spin columns in new collection tubes, store at 4 – 8°C (for up to 24h) for subsequent DNA purification (5.2).

3.3 RNA extraction and purification

▲ **All centrifugations are conducted at ambient temperature (AT)!**

- 10) Add 350 µl ethanol 70% to the flow-through in collection tubes from step 9, pipet 5 times up and down to mix.
- 11) Pipet samples quickly - but carefully - to labelled RNeasy spin columns. Avoid touching the membrane with the filter tip.
- 12) Centrifuge at 9000g for 15 sec, discard flow-through and transfer RNeasy spin columns to new collection tubes.
- 13) Add 700 µl Buffer RW1 to the RNeasy spin columns.
- 14) Centrifuge at 9000g for 15sec, discard flow-through and transfer RNeasy spin columns to new collection tubes.
- 15) Add 500 µl Buffer RPE to RNeasy spin columns.
- 16) Centrifuge at 9000g for 15sec, discard flow-through and transfer RNeasy spin columns to new collection tubes.
- 17) Add 500 µl ethanol 80% to RNeasy spin columns.
- 18) Centrifuge at 9000g for 2 min, discard flow-through with collection tubes.
- 19) Place spin columns in new collection tubes, open lid and centrifuge at 9000g for 5 min.
- 20) Discard collection tubes with flow-through.
- 21) Place spin columns in labelled 1.5ml Eppendorf tubes (provided with the kit), pipet 25 µl RNase-free water directly onto the spin column membrane. Avoid touching the membrane with the filter tip!
- 22) Centrifuge at 9000g for 1 min, to elute RNA. Place eluates immediately on ice!
- 23) Repeat step 21) for a second elution with 25 µl RNase-free water. Place eluates immediately on ice or freeze at -70°C.

4. Reverse transcription of *M. ulcerans* whole transcriptome RNA to cDNA

4.1. Kit

QuantiTect Reverse Transcription Kit contains: RT Primer Mix, RT Buffer, RNase free water, gDNA Wipeout Buffer

4.2. Preparations

- I) Kit: Premix RT Primer Mix and RT Buffer in a 1:4 ratio (n x 1 µl RT Primer Mix plus 4 x n x 1 µl RT Buffer; n= No. of reactions) and label with RT reaction buffer (stable at -20°C for 12 months).
- II) In case the thermomixer does not provide an adapter for 0.2 ml tubes: Prepare 1.5 ml reaction tubes filled with RNase free water (DEPC treated water) according to the sample size and incubate in thermomixer(s) at 42°C (and 95°C).
- III) Label 0.2 ml PCR reaction tubes.

4.3. Reverse transcription

▲ **Work on ice!**

Genomic DNA wipeout (gDNA wipe out):

- 24) Add 2 µl gDNA Wipeout Buffer to 12 µl template RNA from step 23 in labelled 0.2 ml reaction tubes (mix by flicking tubes, centrifuge briefly to ensure that all potentially contaminating DNA is in the reaction mix).
- 25) Store remaining RNA on ice for subsequent, optional quantification or gel-electrophoresis for quality control purposes or freeze at -70°C.
- 26) Incubate at 42°C for 5 min.
- 27) Inactivate reactions at 95°C for 3 min and put samples immediately on ice.

28) Aliquot 1 wipeout control (2 µl) per sample (wipeout control = genomic DNA wipeout without subsequent reverse transcription) as negative control and store at -20°C.

Reverse transcription:

29) Add 1 µl Reverse Transcriptase (keep RT always on ice!), 5 µl premixed RT reaction buffer and 2 µl RNase free water to the samples from step 28. Incubate at 42°C for 15 min.

30) Inactivate Reverse Transcriptase at 95°C for 3 min and store transcribed cDNA on ice for subsequent 16S rRNA RT-qPCR or at -20°C for long-term storage.

▲ *Optionally conduct RNA quality control procedures: Quantification of RNA by fluorometry (e.g. Qubit, Invitrogen) and/or RNA gel-electrophoresis.*

5. DNA extraction

▲ *Reagents and material as described under 2.1 & 2.2. Samples from step 9 (3.2) are processed!*

5.1 Preparations

I) Preheat Buffer EB to 70°C (50 µl + 10 % per sample) prior to DNA elution.

5.2 DNA extraction and purification

31) Add 500µl Buffer AW1 to labelled AllPrep DNA spin columns from step 9 (3.2).

32) Centrifuge at 9000 g for 15sec, discard flow-through.

33) Add 500µl Buffer AW2 to spin columns.

34) Centrifuge at 9000 g for 2 min, discard collection tube with flow-through. (If column contacts flow-through: empty the collection tube and centrifuge the spin column again at 9000 g for 1 min).

35) Place spin columns in labelled 1.5 ml reaction tubes and add 50µl Buffer EB (preheated to 70°C, see 5.1, I) directly onto spin column membrane.

36) Incubate 2 min at AT.

37) Centrifuge at 9000 g for 1 min.

38) Discard AllPrep DNA spin column, DNA is in eluate.

39) Store at 4 - 8°C for subsequent IS2404 qPCR and/or at -20°C for long-term storage.

4. Protokoll qPCR

| | | |
|---|--------------------|---|
|  | Protocol S3 |  |
| Combined 16S rRNA RT/IS2404 qPCR assay | | |
| DITM (LMU), KATH and KCCR (KNUST) | | v1 03.01.2012 |

1. General considerations

This document describes the standard operating procedure for the application of the combined 16S rRNA RT/IS2404 qPCR assay on a Bio-Rad CFX96 real-time PCR detection system. The assay detects *M. ulcerans* cDNA (16S rRNA) and DNA (IS2404) from the same clinical sample or culture suspension. The assay consists of two amplification procedures:

- 1) 16S rRNA RT-qPCR
- 2) IS2404 qPCR

The “PCR Master Mix” must be prepared in a laboratory free of DNA amplicons. The laboratory must be equipped with lab coats, gloves and all necessary laboratory items exclusively used in this room.

▲ = **Note!**

2. Preparations

2.1 Reagents & Material

- Primer IS2404 TF : 5' aaa gca cca cgc agc atc t'3 (TibMolBiol, Berlin, Germany)
- Primer IS2404 TR : 5' agc gac ccc agt gga ttg'3 (TibMolBiol)
- Probe IS2404 TP2: 5' FAM-ccg tcc aac gcg atc ggc a-BBQ'3 (TibMolBiol)
- Primer MU16 TF: 5' cga tct gcc ctg cac ttc'3 (TibMolBiol)
- Primer MU16 TR: 5' cca cac cgc aaa agc tt'3 (TibMolBiol)
- Probe MU16 TP: 5' 6FAM-cac agg aca tga atc ccg tgg tc-BBQ'3 (TibMolBiol)
- 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (no ROX), 1 ml (SolisBioDyne, Tartu, Estonia, ref# 08- 15-00001)
- Exogenous internal positive control (IPC) reagent (VIC), 200 rct. (Invitrogen, Karlsruhe, Germany, ref# 4308323)
- **Optional for exact quantification:** IS2404 Standard (GenExpress, Berlin, Germany)
- DEPC (Diethylpyrocarbonate) treated water, 1 L (Carl Roth, Essen, Germany, ref# T143.3)
- Reaction tubes, 1.5 ml, DNase/RNase free (Kisker, Steinfurt, Germany)
- 96 well multiplates, clear, with seals (BioRad, ref# MLL9601)
- 10 µl, 100 µl, 1000µl pipettes
- 10 µl, 100 µl, 1000µl pipette filter tips, DNase/RNase free (Kisker)
- Disposable gloves, non-sterile
- BioRad CFX96 real-time PCR detection system, centrifuge for multiplates, mini table centrifuge, Vortex, tube rack

5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus contains:

- HOT FIREPol® DNA Polymerase
- 5 x Probe qPCR buffer
- 15 mM MgCl², 1 x PCR solution – 3 mM MgCl²
- dNTPs, including dTTP which improves reaction sensitivity and efficiency

Exogenous internal positive control (IPC) reagent contains:

Exo IPC Mix with a 5'VIC-3'TAMRA labelled probe incl. corresponding primers and Exo IPC DNA.

2.2 Storage and preparation of reagents

Primers, probes, qPCR Mix Plus and Exo IPC Mix must be stored in aliquots at -20 °C in a laboratory free of DNA amplicons; store primers and probes in the dark. The EXO IPC DNA is stored in the DNA extraction room at -20°C.

3. Setting up the qPCR reactions

▲ **The following steps are performed in the “Master Mix laboratory”!**

The reagents are thawed and a master mix of all reagents is prepared. Therefore the following protocols have to be multiplied by the number of samples to be tested (incl. all controls plus 10%).

A TaqMan exogenous internal positive control (IPC) is used in each amplification reaction to exclude false negative results due to inhibition (optionally the Exo IPC DNA can be already added prior to extraction to control the performance of the extraction procedure). Cloned *IS2404* standards and *M. ulcerans* whole transcriptome cDNA are used as positive run controls for the *IS2404* and 16S rRNA qPCR assay, respectively. To exclude contaminations with *M. ulcerans* DNA no template controls (containing H₂O instead of template; one control for each assay) and negative extraction controls (*IS2404* qPCR) are processed in the same way like the samples. To exclude DNA contamination of RNA extracts one negative wipeout control (i.e. aliquot of each extract following gDNA wipeout before reverse transcription) per cDNA sample is subjected to *IS2404* qPCR.

Before adding templates to the respective reaction mix, a PCR protocol indicating sample IDs and numbers of wells is prepared (e.g. S4 - 16S rRNA RT/*IS2404* qPCR run protocol). If using protocol S4, master mix calculation follows automatically after sample ID's are entered.

To avoid any contamination, first cDNA samples followed by negative and wipeout controls are added to the master mixes and the respective wells are sealed before DNA extracts and positive controls are added.

Master Mix 16S rRNA RT qPCR

| Reagent | per reaction in µl | Stock solution | Final conc. |
|--------------------------------------|-----------------------|-------------------|-------------|
| DEPC water | 8,60 | - | - |
| MU16S TF | 1,00 | 10µM | 0,5µM |
| MU16S TR | 1,00 | 10µM | 0,5µM |
| MU16S TP | 1,00 | 5µM | 0,25µM |
| qPCR Mix Plus | 4,00 | 5 U/µl | 0,025 U/µl |
| Exo IPC Mix | 2,00 | 10x | 1x |
| Exo IPC DNA | 0,40 | 50x | 1x |
| Total vol. Mastermix [µl] | 18,00 | | |
| Template cDNA | 2,00 | | |
| Final volume | 20,00 | | |

Master Mix IS2404 qPCR

| Reagent | per reaction in μ l | Stock solution | Final conc. |
|---|----------------------------|-------------------|------------------|
| DEPC water | 8,60 | - | - |
| IS2404 TF | 1,00 | 10 μ M | 0,5 μ M |
| IS2404 TR | 1,00 | 10 μ M | 0,5 μ M |
| IS2404 TP2 | 1,00 | 5 μ M | 0,25 μ M |
| qPCR Mix Plus | 4,00 | 5 U/ μ l | 0,025 U/ μ l |
| Exo IPC Mix | 2,00 | 10x | 1x |
| Exo IPC DNA | 0,40 | 50x | 1x |
| Total vol. Mastermix [μl] | 18,00 | | |
| Template DNA | 2,00 | | |
| Final volume | 20,00 | | |

The Master Mix is prepared in a 1.5 ml reaction tube for each assay. Exo IPC DNA is added to the Master Mix in the DNA extraction laboratory. The 96 well multiplates are filled with 18 μ l of the reaction mix according to the sample size (including all controls). Following addition of templates the 96 well multiplate is sealed (wear gloves!) and centrifuged at 5000 x g for 2 min.

The **BioRad CFX96** (alternatively a comparable real-time detection system) is programmed according to the manufacturer's specifications using the following settings:

| Steps | Temperature | Duration | Number of cycles |
|---|-------------|------------|------------------|
| 1. Initial Denaturation | 95°C | 15 minutes | 1 |
| 2. Denaturation | 95°C | 15 seconds | 40 |
| 3. Annealing & Extension | 60°C | 60 seconds | |
| Activate detection of channels VIC and FAM for all wells following each cycle after step 3 | | | |

The 96-well multiplate is transferred to the BioRad CFX96 and the programme is launched.

4. Interpretation of results

An exponential curve indicates a positive signal from specific amplification. A negative result produces no curve but a detection line below the threshold.

Table 1 and 2 provide an overview of all possible interpretations of IS2404 qPCR and 16S rRNA RT qPCR results respectively.

Table 1. Interpretation of IS2404 qPCR results

| Type of sample | FAM signal | VIC signal | Interpretation |
|---|------------|------------|------------------------|
| <i>M. ulcerans</i> DNA from clinical samples or cultures; positive, wipeout or negative controls* | positive | positive | Positive qPCR reaction |
| | positive | negative | Positive qPCR reaction |
| | negative | positive | Negative qPCR reaction |
| | negative | negative | Reaction inhibited** |

*The positive run controls must result in a positive PCR reaction. The negative controls (i.e. no template control, negative extraction control and wipeout control) must remain negative. A positive "no template control" indicates contamination of reagents, a positive extraction control indicates cross-contamination during the extraction procedure and a positive wipeout control indicates DNA contamination of RNA extracts.

**Inhibited reactions must be repeated in a tenfold dilution.

Table 2. Interpretation of 16S rRNA RT-qPCR results

| Type of sample* | FAM signal | VIC signal | Wipe out control* | Interpretation*** |
|---|------------|------------|-------------------|--|
| <i>M. ulcerans</i> cDNA from clinical samples or cultures | positive | positive | negative | Positive PCR reaction |
| | positive | negative | negative | Positive PCR reaction |
| | negative | positive | negative | Negative PCR reaction |
| | negative | negative | negative | Reaction inhibited |
| | positive | positive | positive | DNA contamination |
| | positive | negative | positive | DNA contamination |
| | negative | positive | positive | DNA contamination |
| | negative | negative | positive | Reaction inhibited and DNA contamination |
| Positive run control and negative no template control | positive | positive | NA | Positive PCR reaction |
| | positive | negative | NA | Positive PCR reaction |
| | negative | positive | NA | Negative PCR reaction |
| | negative | negative | NA | Reaction inhibited |

*The positive run controls must result in a positive PCR reaction. The negative controls (i.e. no template control) must remain negative. A positive “no template control” indicates DNA contamination of reagents.

**IS2404 qPCR result of corresponding gDNA Wipe out controls.

***Inhibited reactions (usually not seen with cDNA) must be repeated in a tenfold dilution.

NA, not applicable



Eidesstattliche Versicherung

Müller, Dominik Matthias

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Etablierung & Validierung eines RNA-basierten molekularen Assays zur Viabilitätstestung von *Mycobacterium ulcerans*“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 31.01.2020

Dominik Müller

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand