

Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin  
der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Michael Hölscher

*Etablierung und Validierung eines optimierten molekularen Assays zur Bestimmung von  
Rifampicin-Resistenzen von Mycobacterium ulcerans.*

Dissertation

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

Vorgelegt von

Moritz Jansson

aus München

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Hölscher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Achim Hörauf

Prof. Dr. Dennis Nowak

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Marcus Beissner

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2020

Teile der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

Beissner, M., Syman, D., Phillips, R.O., Amoako, Y.A., Awua-Boateng, N.-Y., Sarfo, F.S., **Jansson, M.**, Huber, K.L., Herbinger, K.-H., Battke, F., Löscher, T., Adjei, O. and Bretzel, G. 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.* 2012 Aug; 6(8): e1756.

Beissner, M., Piten, E., Maman, I., Syman, D., **Jansson, M.**, Nitschke, J., Amekuse, K., Kobara, B., Wiedemann, F., Hoffmann, H., Diefenhardt, A., Badziklou, K., Banla Kere, A., Löscher, T. and 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.* 2012 Jul; 6(7): e1747.

**Jansson, M.**, Beissner, M., Phillips, R.O., Badziklou, K., Piten, E., Maman, I., Sarfo, F.S., Huber, K.L., Rhomberg, A., Syman, D., Wagner, M., Wiedemann, F., Nitschke, J., Kere, A.B., Herbinger, K.H., Adjei, O., Löscher, T. and Bretzel, G. Comparison of two assays for molecular determination of rifampin resistance in clinical samples from patients with Buruli ulcer disease. *J Clin Microbiol.* 2014 Apr; 52(4): 1246–1249.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AG</b>	Arbeitsgruppe
<b>AITM</b>	Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin an der medizinischen Klinik und Poliklinik IV des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
<b>BBQ</b>	Blackberry-Quencher
<b>Bp</b>	Basenpaare
<b>Bseek-F</b>	<i>rpoB</i> seek Forward
<b>BUD</b>	Buruli Ulkus Erkrankung (engl.: „Buruli Ulcer disease“)
<b>Bzw</b>	Beziehungsweise
<b>CLA</b>	Clarithromycin
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>Ct</b>	Zyklusschwelle (engl.: „cycle threshold“)
<b>d</b>	Tag (lat.: „die“)
<b>ddNTP</b>	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxynukleosidtriphosphat
<b>etc.</b>	Et cetera
<b>FAM</b>	Fluoresceinamidite
<b>FNA</b>	Feinnadelaspirat
<b>FZ</b>	Forschungszentrum
<b>GTQ</b>	Gentechnologische Qualität
<b>His</b>	Histidin
<b>i.m.</b>	Intramuskulär
<b>i.v.</b>	Intravenös
<b>ID</b>	Identifikationsnummer
<b>IS 2404</b>	Insertionssequenz 2404
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>KOD</b>	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>
<b>M.</b>	<i>Mycobacterium</i>
<b>MDR-TB</b>	multiresistente Tuberkulose (engl.: „multi-drug resistant TB“).
<b>MDT</b>	Antibiotische Mehrfachtherapie (engl.: „multi-drug therapy“)
<b>mg</b>	Milligramm
<b>min</b>	Minute(n)
<b>MPM</b>	Mykolakton-produzierende Mykobakterien (engl.: „mycolactone-producing mycobacteria“)

<b>MTBC</b>	Mycobacterium-Tuberkulosis-Komplex
<b>MuB-F+R</b>	<i>Mycobacterium ulcerans rpoB</i> Forward und Reverse
<b>MVP</b>	Max von Pettenkofer-Institut
<b>NA</b>	Nicht zutreffend (engl.: „not applicable“)
<b>NCBI</b>	Nationales Zentrum für Biotechnologische Information (engl.: „national center for biotechnology information“)
<b>NRZ</b>	Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien
<b>NTD</b>	Vernachlässigte Tropenkrankheiten (engl.: „neglected tropical diseases“)
<b>NTM</b>	Nicht tuberkulöse Mykobakterien (engl.: „nontuberculous mycobacteria“)
<b>OADC</b>	Ölsäure, Albumin, Dextrose und Catalase
<b>p.o.</b>	Über den Mund (lat.: „per os“)
<b>PANTA</b>	Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim und Azlocillin
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion (engl.: „polymerase chain reaction“)
<b>POCT</b>	Patientennahe Diagnostik (engl.: „point-of-care-testing“)
<b>qPCR</b>	Quantitative Polymerasekettenreaktion (engl.: „quantitative polymerase chain reaction“)
<b>RMP</b>	Rifampicin
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute (engl.: „rounds per minute“)
<b>RRDR</b>	Rifampicin Resistenz determinierende Region (engl.: „rifampicin resistance determining region“)
<b>rRNA</b>	Ribosomale Ribonukleinsäure
<b>s.o.</b>	Siehe oben
<b>SER</b>	Serin
<b>SNP</b>	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl.: „single nucleotide polymorphism“)
<b>SOP</b>	Standardarbeitsanweisung (engl.: „standard operating procedure“)
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TB</b>	Tuberkulose
<b>u.a.</b>	Unter anderem
<b>v.a.</b>	Vor allem
<b>VNTR</b>	Tandemwiederholungen_(engl.: Variable Number Tandem Repeats)
<b>WHO</b>	Weltgesundheitsorganisation (engl.: „world health organisation“)
<b>z.B.</b>	Zum Beispiel
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>µm</b>	Mikromolar

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Definition.....	1
1.2	Epidemiologie.....	1
1.3	Transmission.....	2
1.4	<i>Mycobacterium ulcerans</i> .....	3
1.5	Klinische Manifestation.....	3
1.6	Komplikationen der BUD.....	6
1.7	Diagnostik.....	7
1.8	Therapie.....	9
1.9	Antibiotika-Resistenzen: Das Potential und die aktuelle Situation.....	9
1.9.1	Das Potential der Resistenzentwicklung im Kreis der Mykobakterien.....	9
1.9.2	Bisherige diagnostische Möglichkeiten zur RMP Resistenzbestimmung von <i>M. ulcerans</i> 11	
1.9.3	Der molekulare Mechanismus der RMP Resistenz und das Prinzip der molekularen Resistenzbestimmung.....	10
1.9.4	Klinische Verläufe.....	11
2	Problemstellung und Zielsetzung.....	13
3	Material und Methoden.....	15
3.1	Material.....	15
3.1.1	Chemikalien.....	15
3.1.2	Nukleotide und Nukleinsäuren.....	16
3.1.2.1	In der Studie verwendete Nukleotide und Primer-Sequenzen.....	16
3.1.2.2	Im Rahmen der Etablierung des Assay B verwendete Primer.....	16
3.1.3	Test-Kits.....	17
3.1.4	Geräte.....	18
3.1.5	Labormaterial.....	19
3.1.6	Mykobakterielle Referenzstämme und diagnostisches Probenmaterial.....	20
3.2	Methoden.....	25
3.2.1	Begriffsdefinitionen.....	25
3.2.1.1	Spezifität und Sensitivität.....	25
3.2.1.1.1	Analytische Spezifität.....	25
3.2.1.1.2	Analytische Sensitivität (untere Nachweisgrenze).....	25
3.2.1.1.3	Diagnostische Spezifität.....	25
3.2.1.1.4	Diagnostische Sensitivität.....	25

3.2.1.2	Definitionen der Test-Parameter für den Vergleich der Assays A und B an klinischen Proben	25
3.2.1.2.1	Die <i>rpoB</i> -PCR Positivitätsrate	25
3.2.1.2.2	PCR-Inhibitionsrate	25
3.2.1.2.3	Die <i>rpoB</i> -sequencing Positivitätsrate	26
3.2.1.2.4	Die Test-Effizienz	26
3.2.2	Ethische Voraussetzungen	26
3.2.3	Ein- und Ausschluss Kriterien	26
3.2.4	DNA Extrakte von <i>M. ulcerans</i> Kulturen und klinischen Proben	26
3.2.4.1	Nukleinsäurepräparation aus Kulturmateri al	26
3.2.4.2	Art und Herkunft der klinischen Proben	26
3.2.4.3	Konservierung der Proben	27
3.2.5	Datenerfassung und –archivierung	27
3.2.6	Angewendete Labormethoden zum Nachweis der RRDR von <i>M. ulcerans</i>	27
3.2.6.1	PCR-Diagnostik und Agarose Gel-Elektrophorese	27
3.2.6.1.1	PCR-Diagnostik Assay A	27
3.2.6.1.2	PCR-Diagnostik Assay B	27
3.2.6.1.3	Interne Qualitätskontrolle	28
3.2.6.1.4	Agarose Gel-Elektrophorese und Isolierung der PCR-Amplifikate	28
3.2.6.1.5	Isolierung, Aufreinigung und Konservierung der Ziel-DNA	28
3.2.6.2	Sequenzierung der PCR-Amplifikate	28
3.2.6.2.1	Cycle-Sequencing	28
3.2.6.2.2	Aufreinigung des Cycle-Sequencing DNA-Produktes	29
3.2.6.2.3	Fällung, Eluierung und Befüllung der „Optical Plates“	29
3.2.6.2.4	Auswertung der Sequenzen	29
3.2.7	Assay A	29
3.2.8	Assay B	29
3.2.8.1	Etablierung von Assay B	29
3.2.8.1.1	Design der PCR-Primer	29
3.2.8.1.1.1	Bestimmung der Primer Spezifität anhand einer in siliko Analyse	30
3.2.8.1.1.2	Thermodynamische Eigenschaften der Primer	31
3.2.8.1.2	Design des Sequenzier-Primers	32
3.2.8.1.3	Auswahl der Polymerase	32
3.2.8.1.4	In vitro Testung der Primer anhand von Kulturmateri al und Optimierung des PCR-Protokolls	32

3.2.8.2	Technische Validierung von Assay B.....	32
3.2.8.2.1	Analytische Spezifität .....	32
3.2.8.2.1.1	Testung der analytischen Spezifität anhand klinischer Proben .....	32
3.2.8.2.1.2	Testung der analytischen Spezifität bezüglich DNA eng verwandter (myko-) bakterieller Spezies .....	33
3.2.9	Vergleich zwischen Assay A und B.....	33
3.2.9.1	Analytische Sensitivität (untere Nachweisgrenze) .....	33
3.2.9.1.1	Herstellung exakt quantifizierter Verdünnungsreihen aus <i>M. ulcerans</i> DNA-Extrakten aus Kulturmaterial.....	33
3.2.9.1.2	Bestimmung der analytischen Sensitivität (untere Nachweisgrenze) .....	34
3.2.9.2	Vergleich anhand klinischer Proben .....	34
3.2.9.2.1	Erneute Testung klinischer Proben mit negativen/kontaminierten PCR-Ergebnissen in Assay A (aus der Pilotstudie) mit Assay B .....	34
3.2.9.2.2	Vergleichende Testung klinischer Proben mit Assay A und Assay B .....	35
3.2.10	Statistische Auswertung .....	35
4	Ergebnisse.....	36
4.1	Assay B.....	36
4.1.1	Etablierung von Assay B .....	36
4.1.1.1	Design der PCR-Primer .....	36
4.1.1.1.1	Bestimmung der Primer Spezifität anhand einer in siliko Analyse .....	36
4.1.1.1.2	Thermodynamische Eigenschaften der Primer .....	37
4.1.1.2	Design des Sequenzier-Primers .....	37
4.1.1.3	In vitro Testung der Primer anhand von Kulturmaterial und Optimierung des PCR-Protokolls.....	37
4.1.2	Technische Validierung von Assay B.....	37
4.1.2.1	Analytische Spezifität .....	37
4.1.2.1.1	Testung der analytischen Spezifität anhand klinischer Proben .....	37
4.1.2.1.2	Testung der analytischen Spezifität bezüglich DNA eng verwandter (myko-) bakterieller Spezies .....	38
4.1.3	Vergleichende Darstellung von Assay A und B.....	39
4.2	Vergleich zwischen Assay A und B.....	39
4.2.1	Analytische Sensitivität (untere Nachweisgrenze) .....	39
4.2.1.1	Erstellung exakt quantifizierter Verdünnungsreihen aus Kulturmaterial .....	39
4.2.1.2	Bestimmung der analytischen Sensitivität (untere Nachweisgrenze).....	41
4.2.2	Vergleich anhand klinischer Proben.....	42

4.2.2.1	Erneute Testung klinischer Proben mit negativen/kontaminierten PCR Ergebnissen in Assay A aus der Pilotstudie mit Assay B .....	42
4.2.2.2	Vergleichende Testung klinischer Proben durch Assay A und Assay B .....	42
5	Diskussion .....	44
6	Zusammenfassung.....	48
7	Danksagung .....	59
8	Curriculum Vitae.....	60
9	Anhang.....	61
9.1	Anleitung zur Nukleinsäurepräparation aus Kulturmaterial und klinischen Proben .....	61
9.2	Anleitung zur Aufreinigung der Cycle-Sequencing Produkte und Vorbereitung für die anschließende Sequenzierung: .....	62
9.3	Übersicht der verschiedenen getesteten Primer-Paare zur Etablierung von Assay B .....	63

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Chemikalien welche im Rahmen der Studie verwendet wurden. In Anlehnung an Huber (Huber 2013).</i> .....	15
Tabelle 2: <i>Beschreibung der verwendeten Nukleotide und Primer-Sequenzen.</i> .....	16
Tabelle 3: <i>Auflistung der verwendeten Test-Kits.</i> .....	17
Tabelle 4: <i>In der Studie verwendete Geräte. In Anlehnung an Huber (Huber 2013).</i> .....	18
Tabelle 5: <i>In der Studie verwendetes Labormaterial. In Anlehnung an Huber (Huber 2013).</i> .....	19
Tabelle 6: <i>Bakterienspezies zur Spezifitätstestung des Assays B.</i> .....	20
Tabelle 7: <i>M. ulcerans Kultur.</i> .....	20
Tabelle 8: <i>IS2404-PCR negative klinische Gesamt DNA Extrakte.</i> .....	21
Tabelle 9: <i>IS2404 PCR positive klinische Gesamt DNA Extrakte die in der Pilotstudie entweder negative oder kontaminierte Ergebnisse ergaben.</i> .....	21
Tabelle 10: <i>IS2404-PCR positive klinische Gesamt DNA Extrakte vor Beginn antimikrobieller Therapie.</i> .....	24
Tabelle 11: <i>Übersicht der Mykobakterien, anhand welcher die in siliko Analyse der polymorphen Genregion durchgeführt wurde.</i> .....	31
Tabelle 12: <i>Thermodynamische Eigenschaften der in Assay B verwendeten Mub-F+R Primer.</i> .....	37
Tabelle 13: <i>Thermodynamische Eigenschaften des in Assay B verwendeten Bseek-F Primer.</i> .....	37
Tabelle 14: <i>Auflistung der errechneten Genomäquivalente/2 µl der Verdünnungsreihe der M. ulcerans DNA Kulturextrakte.</i> .....	41
Tabelle 15: <i>PCR- und Sequenzierungs-Ergebnisse aller in den Vergleich zwischen Assay A und B eingebrachten klinischen Proben.</i> .....	43
Tabelle 16: <i>SOP zur Nukleinsäurepräparation aus Kulturmaterial und klinischen Patientenproben.</i> ...	61
Tabelle 17: <i>Anleitung zur Aufreinigung der Cycle Sequencing Produkte und zum Befüllen der Optical Plates.</i> .....	62
Tabelle 18: <i>Forward-und Reverse- Primer und daraus abgeleitete Primer-Paare welche im Rahmen der Etablierung von AssayB getestet wurden.</i> .....	63

## Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: <i>Weltweite Verteilung der Buruli Ulkus Erkrankung (Quelle: WHO).</i> .....	2
Abbildung 2: <i>Nicht-ulzerative Formen der BUD</i> .....	5
Abbildung 3: <i>Ulzerative Formen der BUD</i> .....	6
Abbildung 4: <i>Komplikationen nach Abheilung der BUD</i> .....	7
Abbildung 5: <i>Vergleichende Darstellung der von Kim et. al. 2003 beschriebenen polymorphen Genregion innerhalb des rpoB-Gens</i> .....	36
Abbildung 6: <i>Agarose Gel-Elektrophorese im Anschluss an die MuB-F+R PCR</i> .....	38
Abbildung 7: <i>Darstellung des Abschnitts des rpoB-Gens welches in Assay B durch die PCR-Primer (Mub-F+R) amplifiziert wurde.</i> .....	39
Abbildung 8: <i>Darstellung der Amplifikations-Zyklen der IS2404-qPCR zur Quantifizierung der Verdünnungsreihen</i> .....	40
Abbildung 9: <i>Darstellung der in der IS2404-qPCR angewendeten Standardkurve</i> .....	40

# 1 Einleitung

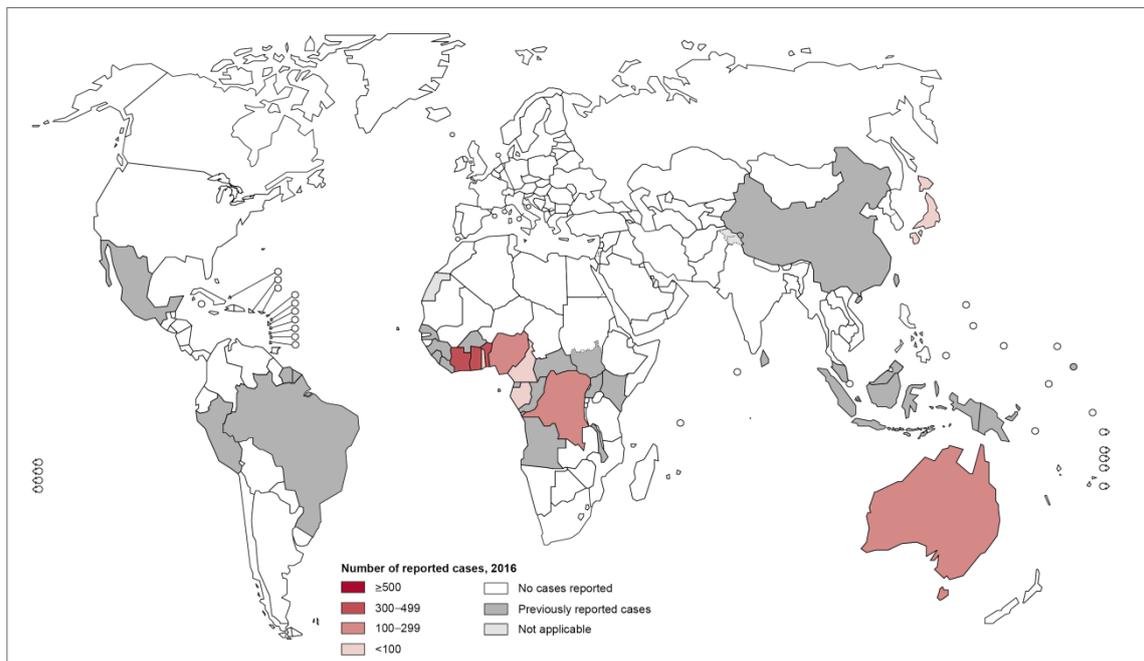
## 1.1 Definition

Die Buruli Ulkus Erkrankung (engl.: „Buruli ulcer disease, BUD“) ist eine chronisch nekrotisierende Infektionskrankheit der Haut sowie des subkutanen Fettgewebes welche durch *Mycobacterium ulcerans* verursacht wird [1] [2]. Seltener ist auch eine Ausbreitung auf die Knochen möglich [3]. Die BUD ist die dritthäufigste mykobakterielle Erkrankung bei immunkompetenten Menschen und zählt zu der Gruppe der vernachlässigten Tropenkrankheiten (engl.: „neglected tropical diseases, NTD“), welche derzeit 20 Infektionskrankheiten umfasst, die besonders in von Armut betroffenen Ländern vorkommen [4] [5].

## 1.2 Epidemiologie

Bisher wurden Fälle der BUD in 35 Ländern (WHO Regionen: Afrika, Süd-Amerika, Asien, Westpazifik) beschrieben, die meisten davon aus West- und Zentral-Afrika. Aus 13 dieser Länder, die meist tropisches oder subtropisches Klima aufweisen, werden jährliche Fallzahlen an die WHO übermittelt (Stand 2017). Im Jahr 2015 wurden 2046, im Jahr 2016 1920 Fälle gemeldet. Die Länder mit den höchsten Fallzahlen sind Benin, Kamerun, Elfenbeinküste, Demokratische Republik Kongo, Ghana, Nigeria, und Australien [4] [1] [6]. Die Verteilung der BUD variiert selbst innerhalb der endemischen Länder stark und zeigt eine herdförmige Verteilung [7] [8]. Da in endemischen Ländern häufig ländliche Regionen mit eingeschränktem Zugang zum Gesundheitssystem und den regionalen Kontrollprogrammen betroffen sind ist es sehr wahrscheinlich, dass die gemeldeten Fälle das volle nationale Ausmaß der Erkrankung nicht wiedergeben [9] [4] [8]. Genaue Zahlen zur Prävalenz und Inzidenz auf nationaler Ebene sind daher für die meisten betroffenen Länder nicht verfügbar. Während in einigen afrikanischen Endemiegebieten in den letzten Jahren ein Rückgang der Fallzahlen beobachtet wurde haben sich die Fallzahlen in Australien in den letzten fünf Jahren fast verdreifacht [10] [11] [4]. Am häufigsten sind in den afrikanischen Endemiegebieten Kinder und Jugendliche unter 15 Jahren von der BUD betroffen [8] [1].

## Distribution of Buruli ulcer, worldwide, 2016



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 2017. All rights reserved

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



**Abbildung 1: Weltweite Verteilung der Buruli Ulkus Erkrankung (Quelle: WHO).**

### 1.3 Transmission

Es existieren keine Hinweise für eine direkte Mensch zu Mensch Übertragung der BUD [12] [13]. Das genaue Keimreservoir und der exakte Übertragungsweg auf den Menschen sind bis heute nicht aufgeklärt [8] [11] [4] [1]. Ein komplexer Zusammenhang zwischen dem gehäuften Auftreten von BUD in Westafrika und geographischer Nähe zu stehenden bzw. langsam fließenden Gewässern gilt als erwiesen [14] [2]. Möglichkeiten der Infektion durch direkten Kontakt mit kontaminiertem Wasser, Aerosolen oder durch Vektoren werden diskutiert [2]. In zahlreichen afrikanischen Wasserorganismen sowie Fischen, Schnecken (lat.: „*Planorbidae*“ [Familie]), oder Schwimmwanzen (lat.: „*Naucoridae*“ [Familie]) wurde der Nachweis von *M. ulcerans* DNA mittels PCR erbracht [15] [16] [17] [18]. In Bezirken des australischen Bundesstaates Viktorien wurde *M. ulcerans* sowohl in Boden- und Wasserproben als auch in den Ausscheidungen von freilebenden Possums (lat.: „*Pseudocheirus peregrinus*“ und „*Trichosurus vulpecula*“ [Spezies]) nachgewiesen [19]. Ebenfalls wurde in demselben Gebiet *M. ulcerans* DNA in verschiedenen Mückenarten (lat.: „*Aedes sp.*“, „*Coquillettia sp.*“, „*Culex sp.*“ [Spezies]) mittels PCR Analysen nachgewiesen und eine geographische Korrelation zwischen der Prävalenz von BUD und der Verbreitung der betroffenen Mücken festgestellt [20] [21]. Im Labor wurde die Möglichkeit einer mechanischen Inokulation durch Mikrotraumata (Mückenbisse, Nadelstiche) nach kutaner Kontamination mit *M. ulcerans* am Mausmodell nachgewiesen. Bei fehlendem Trauma entwickelten sich trotz kutaner *M. ulcerans* Exposition keine Ulzera [22]. Im Zusammenhang mit den zahlreichen Nachweisen von *M. ulcerans* DNA aus der Umwelt und Tieren wird die Möglichkeit einer Übertragung auf den Menschen durch Mikrotraumata über unterschiedliche Transmissionswege in verschiedenen Endemiegebieten diskutiert [22] [12].

## 1.4 *Mycobacterium ulcerans*

*M. ulcerans* ist ein langsam wachsendes, grampositives, säurefestes Stäbchenbakterium. Es ist ein Vertreter der atypischen Mykobakterien (engl.: „nontuberculous mycobacteria“, NTM) und gehört zu der Familie der *Mycobacteriaceae*, Gattung *Mycobacterium*. Die Gattung umfasst eine große Diversität verschiedener obligat und fakultativ pathogener Keime, sowie Umweltkeime ohne humanpathologische Bedeutung [23]. Traditionelle Differenzierungsmethoden basieren auf Unterschieden in der Kultur oder biochemischen Merkmalen. Genetische Methoden (z.B. DNA Sequenzierung, Variable Number Tandem Repeat Analysen [VNTR], Einzelnukleotid-Polymorphismus Analysen [SNPs]) haben zu neuen Möglichkeiten der phylogenetischen Differenzierung innerhalb der Gattung geführt und stellen eine wichtige Methode für die epidemiologische Forschung dar [24]. Ein naher Verwandter des *M. ulcerans* ist das schnell wachsende *Mycobacterium marinum*, ein aquatischer Umweltkeim, welcher bei Fischen und Fröschen granulomatöse Erkrankungen verursacht und gelegentlich beim Menschen zu granulomatösen Hautläsionen führt [25] [26]. Durch genomweite SNP Analysen wurde nachgewiesen, dass sich *M. ulcerans* zusammen mit allen weiteren Mykolakton produzierenden Mykobakterien (engl.: „mycolactone- producing mycobacteria“, MPM) im Laufe der Evolution aus einem gemeinsamen *M. marinum* Progenitor spezialisiert hat um andere ökologische Nischen besetzen zu können [27]. Die weiteren bislang beschriebenen MPMs umfassen fisch- sowie froschpathogene Spezies (einige untypische Kladen des *M. marinum*, *M. pseudoshottsii* [strukturelle Variante F], *M. liflandii* [strukturelle Variante E])[27] [28] (Bretzel 2018). Die Entwicklung des *M. ulcerans* und aller anderen MPMs ist durch reduktive Evolution des Genoms (*M. marinum* verfügt über ein 6,6 Millionen Basenpaar [Bp] umfassendes Genom, *M. ulcerans* über ein 5,8 Millionen Bp umfassendes Genom) mittels DNA Deletionen und Neuankordnungen erfolgt [25] [27]. Die Präsenz des pMUM Plasmids mit der resultierenden Fähigkeit Mykolakton zu produzieren stellt den bedeutendsten Pathogenitätsfaktor von *M. ulcerans* dar. Bei dem Mykolakton handelt es sich um ein Polyketid, welches sich durch eine hohe Zytotoxizität auszeichnet und die charakteristischen, großflächigen Ulzera der BUD verursacht [29] [30]. Zudem hat es eine immunsupprimierende und analgetische Wirkung, welche die Entstehung einer lokalen Entzündungsreaktion verhindert und die in der Regel geringen Schmerzen der Betroffenen erklärt [11] [31] [32]. Das nicht kodierende Insertionselement IS2404 (Insertionssequenz 2404) ist im *M. ulcerans* Genom mehr als 200 mal vorhanden, existiert jedoch nicht in den humanpathogenen *M. marinum* Stämmen [27]. Die spezifische Sequenz der IS2404 spielt angesichts der ansonsten phylogenetisch hoch konservierten Gensequenzen eine bedeutende Rolle bei der PCR-basierten Diagnostik von *M. ulcerans* aus klinischen Proben (siehe 1.7.1.7). Während der Nachweis der IS2404 anhand klinischer Proben als *M. ulcerans* spezifisch angesehen wird, existiert die IS2404 in den fisch- und froschpathogenen MPMs so dass der IS2404 Nachweis anhand von Umweltproben nicht *M. ulcerans* spezifisch ist [27].

## 1.5 Klinische Manifestation

Die Inkubationszeit wurde durch retrospektive Studien in Australien bestimmt und liegt bei durchschnittlich 4,5 Monaten [33] [34]. Die Erkrankung manifestiert sich vorrangig an den Extremitäten wobei die unteren Extremitäten öfter betroffen sind [8]. Zu den nicht-ulzerativen Formen zählen feste, nicht schmerzhaft Knötchen (Noduli, diese Form ist besonders in Afrika verbreitet, siehe Abbildung 2a und 2b) von weniger als 3 Zentimetern (cm) im Durchmesser und erhabene Papeln von weniger als ein cm Größe (besonders in Australien) [35]. Schmerzlose Plaques, bei welchen es sich um verhärtete, meist scharf demarkierte Läsionen der Haut handelt (siehe Abbildung 2c) sowie die ödematöse Form, bei welcher es zu teils großflächigen und diffusen, nicht eindrückbaren Schwellungen der Haut kommt (siehe Abbildung 2d), gehören ebenfalls zu den nicht ulzerativen Formen [35] [36].

Nicht ulzerative Formen der BUD gehen im Verlauf in die ulzerative Form über. Die Ulzera entstehen durch nekrotisches Gewebe der unteren Hautschichten nach Perforation der Epidermis und sind durch unterminierte Wundränder des umliegenden Gewebes charakterisiert (siehe Abbildung 3a-d). Oft haben sie weiß-gelbliche, „baumwollartige“ Ablagerungen in ihrem Zentrum [35]. Kleine Ulzera (1-2 cm) können selbstlimitierend verlaufen [2] oder in große Ulzera übergehen, welche unter großflächiger Vernarbung gegebenenfalls mit Einbeziehung von Gelenken verheilen, und durch Ankylosierung des betroffenen Gewebes zur vollständigen Gelenksteife führen können (siehe 1.6, Abbildung 4a und 4b). Eine metastatische Ausbreitung kann zum Befall anderer Körperbereiche mit unterschiedlichen Manifestationsformen führen. Die Ausbreitung erfolgt vermutlich über das Lymphsystem oder die Blutbahn [2] [37].

Bei der osteomyelitischen Form der BUD kann es durch den unspezifischen klinischen Verlauf zur verspäteten Diagnose und Therapieeinleitung kommen. Eine in Benin durchgeführte Studie zeigte, dass die Osteomyelitis in 60 % per continuitatem durch Ulzera, welche bis zum unterliegenden Knochen fortschreiten, entsteht [3]. Metastatische Osteomyelitis ereignete sich in ca. 15 % der Fälle. Jedoch traten ca. 25 % der Knochenläsionen ohne im Voraus aufgetretene Hautläsionen auf. In 56 % der Fälle kam es in Folge des Knochenbefalls zu Spätkomplikationen [3].

Im Rahmen der Chemotherapie wurde in einigen Fällen nach initialer klinischer Besserung eine Vergrößerung der Ulcera beobachtet. Es wird vermutet, dass unter Chemotherapie durch Abnahme des immunsupprimierenden Mykolaktons und Freisetzung mykobakterieller Antigene eine *M. ulcerans* spezifische Immunreaktion zu einer verstärkten Gewebedestruktion führt [37] [38]. Diese sogenannten „paradoxen Reaktionen“ stellen kein Therapieversagen dar und führen unter antibiotischer Therapie zu einer Abheilung [39] [37]. Zudem wurde das Auftreten von sekundären Läsionen nach Beendigung der antibiotischen Therapie beobachtet [37] [40] [41]. Die histopathologische Begutachtung zeigte charakteristische Eigenschaften der BUD sowie den Nachweis degenerierter säurefester Stäbchenbakterien. Es wird vermutet, dass es sich dabei teils um spät einsetzende paradoxe Reaktionen im Rahmen bereits vorbestehender *M. ulcerans* Läsionen handelt. Sekundäre Läsionen, welche mehr als ein Jahr nach Beendigung der antibiotischen Therapie erscheinen, könnten jedoch durch neu aufgetretene Infektionen verursacht werden, welche nach durchgemachter primärer Infektion durch das Immunsystem effektiv eliminiert werden können [37].



**Abbildung 2: Nicht-ulzerative Formen der BUD (Quelle: AITM)**

*Bilder a und b: Nodus; Bild c: Plaque; Bild d: Ödem*

Die ulzerativen Manifestationen werden klinisch in drei Kategorien eingeteilt (siehe Abbildung 3) [35]:

**-Kategorie I:** umfasst eine einzelne Läsion <5 cm (siehe Abbildung 3a).

**-Kategorie II:** Eine einzelne Läsion zwischen 5-15 cm (siehe Abbildung 3b).

**-Kategorie III:** Eine einzelne Läsion >15 cm, multiple Läsionen, Läsionen an Auge, Brust, Genitalien und Osteomyelitis (siehe Abbildung 3c und d).



**Abbildung 3: Ulzerative Formen der BUD (Quelle: AITM)**

*Bild a: kleines Ulcus (Kategorie I); Bild b: Ulcus der Kategorie II; Bilder c und d: zwei Ulzera der Kategorie III*

## 1.6 Komplikationen der BUD

Die BUD weist eine geringe Letalität auf, jedoch tritt auch nach Ausheilung ein hohes Maß an Komplikationen auf [42]. Generell ist ein früher Behandlungsbeginn mit einem geringeren Auftreten von Komplikationen verbunden. Jedoch werden mindestens 70 % der weltweiten BUD Fälle erst im ulzerativen Stadium diagnostiziert [1]. In Afrika befinden sich bei Diagnosestellung etwa 30 % der Ulzera bereits in der Kategorie III [9].

Insbesondere Knochenläsionen ohne vorrausgegangene kutane Manifestationen führen durch späte Diagnose zu einer hohen Komplikationsrate [3]. Das Auftreten von funktionellen Limitationen wurde in zahlreichen Studien unter Einbeziehung unterschiedlicher Behandlungsoptionen (z.B. operative Therapie und/oder Chemotherapie) beschrieben. Dabei zeigte sich im Verlauf in bis zu 57 % der Fälle intensive Narbenbildung mit funktionellen Einschränkungen durch Kontrakturen, Deformationen oder Amputationen (siehe Abbildung 4a und b) [43] [44] [45] [46] [47] [42]; (Stienstra Y: 57 %; Schunk M: 27 %; Ellen D E: 49 %; Barogui Y: ca. 50 %; Beissner M: 11,6 %; WHO: 20-25 %). Während Barogui et al. keinen Unterschied bezüglich der Komplikationen zwischen rein operativ und rein antibiotisch behandelten Patienten ermittelte, zeigte sich in einer Studie in Togo, welche ausschließlich Patienten

nach antibiotischer Therapie einbezogen, eine vergleichsweise geringe Anzahl an funktionellen Einschränkungen (11,6%) [47]. Ödematöse Läsionen, Ulzera der Kategorie III (> 15 cm), Heilungsdauer von > 180 Tagen sowie Bewegungseinschränkungen bei Entlassung zeigten sich als größte Risikofaktoren für funktionelle Einschränkungen [47]. Für die Betroffenen resultieren die funktionelle Einschränkungen in negativen psychosozialen und wirtschaftlichen Auswirkungen [48] [49] [8] [42].



**Abbildung 4: Komplikationen nach Abheilung der BUD (Quelle: AITM)**

*Kontrakturen und funktionelle Limitationen nach Abheilung. Bild a: rechts gluteal und am lateralen Oberschenkel. Bild b: thorakal am vorderen Sternum und supraklavikulär beidseits.*

## 1.7 Diagnostik

Die nicht-ulzerative Form der BUD kann schnell in die ulzerative Form übergehen. Um permanente Folgeschäden zu vermeiden, hat die zeitnahe Diagnostik und Behandlung eine hohe Priorität [42]. Probenmaterial kann in der Form von Wundabstrichen, Feinnadelaspiraten (FNA), Stanzbiopsien oder operativ exzidiertem Gewebe abgenommen werden. Bei nicht-ulzerierten Formen wird die Probe aus dem Zentrum, bei ulzerierten Läsionen aus dem Bereich der unterminierten Wundränder entnommen [50] [4] [51]. Stanzbiopsien werden heutzutage zurückhaltend, meist nur bei bestimmten Indikationen abgenommen, z.B. falls der PCR Nachweis aus FNAs trotz klinisch eindeutigen Verdacht auf BUD nicht gelingt oder zur weiteren Differenzialdiagnostik [52] [51].

Verschiedene Labormethoden zur Diagnostik der BUD stehen zur Verfügung:

-Mikroskopischer Nachweis: Der mikroskopische Nachweis kann anhand von Wundabstrichen und FNAs durchgeführt werden und erfolgt durch Färbung nach Ziehl-Neelsen, Kinyoun oder Auramin-Rhodamin zum Nachweis säurefester Stäbchenbakterien [53] [54] [55]. Die Mikroskopie stellt eine kosteneffektive und schnelle Methode dar und ist unter einfachen Bedingungen bei geringer Laborausstattung durchführbar. Sie erfordert jedoch geschultes Personal und eine ständige Qualitätskontrolle. Die Sensitivität wird zwischen 40-60 % angegeben [54] [56] [57] [58] [59]. (WHO: <60 %; Herbinger K H: 57 %; Siegmund V: 42,7 %; Affolabi D: 49,5-59,4 %; Yeboah-Manu D: 58,4 %).

-PCR: Die IS2404-PCR beruht auf der Amplifikation der IS2404 (siehe 1.4) und ist die am weitesten etablierte molekulare Methode zum Nachweis von *M. ulcerans* [54]. Generell erfordert die PCR Diagnostik die Extraktion und Isolierung von *M. ulcerans* DNA [54]. Es wird angenommen, dass die Spezifität und Sensitivität der IS2404-PCR unter optimalen Bedingungen 100 % erreichen kann [4]. Die konventionelle IS2404-PCR zeigt eine Sensitivität von 79-85 % und hat bei klinischen Proben eine Spezifität von 100 % [53] [56] [60] (Bretzel 2018). Die real-time IS2404-qPCR amplifiziert ebenfalls einen Genabschnitt der IS2404. Das Detektionslimit liegt etwa um das 100-fache unterhalb der konventionellen IS2404-PCR. Weitere Vorteile sind die schnellere Durchführbarkeit und die geringere Arbeitsintensivität [54] [61] [62]. Durch die Etablierung und Validierung eines IS2404-qPCR Assays mit modifizierten Reagenzien besteht zudem die Möglichkeit einer kostengünstigeren Durchführung etwa auf dem Preisniveau der konventionellen IS2404-PCR [61] [54] [55]. Jedoch benötigt die IS2404-qPCR eine vergleichsweise teure Laborausstattung.

-Kultureller Nachweis: *M. ulcerans* kann aus klinischen Proben in speziellen Medien wie z.B. Middlebrook 7H9 Bouillon angereichert mit Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim und Azlocillin (PANTA) oder Ölsäure, Albumin, Dextrose und Catalase (OADC) transportiert und auf Löwenstein-Jensen Medium kultiviert werden [54]. Unter optimalen Wachstumsbedingungen bei Temperaturen von 29-33 °C kann so innerhalb von 9-12 Wochen der Viabilitätsnachweis von *M. ulcerans* erbracht werden. Inkubationszeiten von bis zu neun Monaten wurden jedoch beschrieben [53] [63] [54]. Die Sensitivität in verschiedenen Studien variiert und wird von der WHO mit 20-60 % angegeben [53] [57] [63] [64] [60] [65] [54]. Der zeitintensive kulturelle Nachweis stellte bis vor kurzer Zeit die einzige Methode zum Viabilitätsnachweis und zur Antibiotika-Suszeptibilitätstestung im klinischen Kontext dar [61].

-Histopathologischer Nachweis: Dieser erfolgt durch den Nachweis von säurefesten Stäbchenbakterien und charakteristischer histologischer Merkmale wie epidermale Hyperplasie, Elastolyse, entzündlicher und vaskulärer Veränderungen der Dermis sowie Nekrosen der Subkutis [66] [54]. Durch die hohe Sensitivität dieser Methode von bis zu 90 %, welche bis zu 30 % mehr Verdachtsfälle als positiv bestätigt als andere Methoden, eignet sie sich zur Diagnosesicherung bei unklaren oder negativen Ergebnissen vorangegangener Tests und zur differentialdiagnostischen Abklärung unklarer Ulzera [51] [53] [57] [67]. Allerdings ist der histopathologische Nachweis in Endemiegebieten kaum verfügbar, da er die Entnahme von Gewebeproben erfordert, hohe Anforderungen an Laborpersonal und Labormaterial stellt und teure technische Ausstattung voraussetzt [53] [55] [54].

#### **Ein Überblick über die aktuelle diagnostische Forschung:**

-16S rRNA-Viabilitäts-Assay: Ein kürzlich beschriebener *M. ulcerans* spezifischer und hoch sensibler 16S rRNA-Viabilitäts-Assay basiert auf dem Nachweis von RNA in klinischen Proben, welcher die Stoffwechselaktivität der Mykobakterien nachweist. Der Assay ermöglicht damit den rapiden Viabilitätsnachweis anhand von klinischen Proben und bietet neue Möglichkeiten zur Differenzierung von Sekundärläsionen (siehe 1.9.4). Im klinischen Verlauf kann der Assay zur Beurteilung der mykobakteriellen Viabilität unter Therapie in Kombination mit der IS2404 qPCR zur Bestimmung der Bakterienlast verwendet werden [61] [68]. In einer ersten Studie in Ghana zeigten sich Unterschiede bezüglich der Nachweisdauer von viablen Mykobakterien während der antibiotischen Therapie in Abhängigkeit von der initialen Bakterienlast. Zukünftig könnte ein angepasstes Therapieregime in Abhängigkeit der initialen Bakterienlast etabliert werden [68].

-Zur Steigerung der Verfügbarkeit der diagnostischen Möglichkeiten in den Endemiegebieten wurde eine DRB-PCR (engl.: „dry-reagent-based PCR“) entwickelt. Im Laborversuch zeigte sich die Sensitivität vergleichbar mit der IS2404-PCR. Die eingesetzten Reagenzien sind nicht auf eine in endemischen Ländern schwer umsetzbare Kühlkette angewiesen [69] [57]. Einen weiteren Schritt zur Bereitstellung eines POC Test stellt die sich in Entwicklung befindliche DRB-LAMP PCR (engl.: „dry-reagent-based loop-mediated isothermal amplification“) dar. Dabei handelt es sich um eine kosteneffektive und einfach durchzuführende LAMP PCR Variante, welche in dezentralen Laboren validiert werden soll [70] [71] [72] [73] [55]. Für die DNA Extraktion der klinischen Proben wird jedoch weiterhin eine Kühlkette benötigt. Ein noch ungelöstes Problem zur patientennahen Labordiagnostik (engl.: „point-of-care-testing, POCT“) ist daher die effektive und kostengünstige DNA Extraktion der klinischen Proben [70] [55]. Ein anderer Ansatz zur Entwicklung eines POC Test stellt der Nachweis des Mykolakton durch Dünnschichtchromatographie dar. In einer vergleichenden Studie zeigte sich eine höhere Sensitivität als bei dem mikroskopischen oder kulturellen Nachweis bei jedoch geringerer Spezifität [74].

## **1.8 Therapie**

Die Therapie der BUD bestand bis zum Jahr 2004 im Wesentlichen aus der chirurgischen Exzision der Ulzera und frühen Noduli, je nach Ausmaß des resultierenden Hautdefekts in Kombination mit Spalthauttransplantation [75] [2]. Trotz der operativen Behandlung lag die Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv nach Angaben verschiedener Studien zwischen 6-30 % (Kanga JM: 17,3 %; Amofah G: 16 %; Debacker M: 6,1 %; WHO: 16-30 %); [76] [77] [78] [79] [80]. In verschiedenen Studien wurde die Präsenz von *M. ulcerans* jenseits der makroskopisch gesund erscheinenden Exzisionsränder nachgewiesen [81] [75] [82]. Im Jahr 2004 wurde von der WHO aufgrund von Beobachtungsstudien eine Empfehlung für eine achtwöchige antimikrobielle Chemotherapie mit Rifampicin (RMP) (Dosierung: 10 mg/kg Körpergewicht/d, per os) und Streptomycin (SM) (Dosierung: 15 mg/kg Körpergewicht/d, intramuskulär) ausgesprochen [83] [35]. In einer Cochrane Analyse zeigte sich unter der achtwöchigen antimikrobiellen Therapie eine Heilungsrate von 48-98 %, ermittelt aus den Daten von vier Beobachtungsstudien. Fünf weitere Beobachtungsstudien, welche zusätzlich zu der antibiotischen Therapie einzelne oder alle Patienten einer operativen Versorgung zuführten, zeigten eine Heilungsrate von 84-100% [84]. Die Rezidivraten lagen in verschiedenen Studien unter 2 % [79] [85] [86] [87]. Zwei Studien belegen die Effizienz einer oralen Chemotherapie mit RMP und Clarithromycin (CLA). In einer Studie erfolgte eine vierwöchige rein orale Kombinationstherapie aus RMP- und Clarithromycin nach initialer vierwöchiger RMP- und Streptomycingabe, eine weitere Pilotstudie evaluierte eine achtwöchige RMP- und Clarithromycintherapie [85] [88].

Als Alternative zur Chemotherapie kann eine lokale Wärmetherapie mittels Anwendung eines Hitzepacks durchgeführt angewendet werden. In einer Studie, welche von 2009-2012 in Kamerun durchgeführt wurde, zeigte sich nach 6 Monaten eine Remissionsrate von 92,4 %; 83,7 % der Patienten blieben nach zwei Jahren frei von Rezidiven. In die Studie wurden zu 96 % ulzerative Läsionen (Kategorie I: 19 %, Kategorie II: 64 %, Kategorie III: 19 %) einbezogen. Osteomyelitis durch *M. ulcerans* konnte durch lokale Wärmeanwendung nicht therapiert werden [89].

## **1.9 Antibiotika-Resistenzen: Das Potential und die aktuelle Situation**

### **1.9.1 Das Potential der Resistenzentwicklung im Kreis der Mykobakterien**

Resistenzen gegenüber RMP stellen bei der Tuberkulose ein häufiges und bei der Lepra immer häufiger beschriebenes Problem dar [90] [91]. Risikofaktoren für die Entwicklung von RMP Resistenzen stellen unter anderem eine unzureichende Compliance der Patienten sowie unregelmäßige oder inadäquate

Einnahme von Antibiotika bezüglich der Einnahmedauer, Dosierung und Kombination dar [92]. Nach Entstehung einer RMP Resistenz ist bei der Tuberkulose eine Verbreitung durch Mensch zu Mensch Übertragung möglich. Die WHO schätzt das Vorkommen von multiresistenter Tuberkulose (engl.: „multi-drug resistant TB“ [MDR-TB]) durch Antibiotikaresistenzen innerhalb des Mycobacterium-Tuberculosis-Komplex (MTBC) gegen RMP und Isoniazid auf 5 %, wovon 9 % dieser Stämme zusätzlich Resistenzen gegen zwei der effektivsten „second line“ Medikamente entwickelt haben (engl.: extensively drug-resistant TB [XDR-TB]) [93]. Die Behandlung der Lepra, verursacht durch *M. leprae*, mit RMP im Rahmen einer antimykobakteriellen Kombinationstherapie (engl.: multi-drug treatment [MDT]) ist hocheffektiv, jedoch werden ebenfalls RMP Resistenzen beobachtet. Im Jahr 2009 wurde von der WHO eine Initiative zur Bestimmung von antibiotikaresistenten *M. leprae* Stämmen eingeführt in welcher auf das molekulare Testverfahren zurückgegriffen wird, welches bei *M. tuberculosis* angewendet wird (siehe 1.9.2) [94]. In der ersten WHO koordinierten Studie zur genetischen Resistenzbestimmung zeigten sich anhand von 1932 Proben aus insgesamt 19 Ländern 182 genetische Mutationen welche mit phänotypischen Antibiotika-Resistenzen (gegenüber Dapson, RMP und Ofloxacin) korrelieren, 74 davon gegenüber RMP [91].

Derzeit gibt es keinen Anhalt für eine Mensch zu Mensch Übertragung der BUD [12] [13]. Dadurch ist eine rasche Ausbreitung möglicher RMP resistenter *M. ulcerans* Stämme wie im Falle der Lepra und Tuberkulose nach heutigem Wissensstand nicht wahrscheinlich. Es stehen daher die negativen Auswirkungen möglicher Antibiotika-Resistenzen auf die individuelle antibiotische Therapie und Heilung im Vordergrund. Durch die kürzlich eingeführte Chemotherapie kann die Entstehung von RMP Resistenzen analog zur Resistenzentwicklung bei der Tuberkulose und Lepra begünstigt werden.

### **1.9.2 Der molekulare Mechanismus der RMP Resistenz und das Prinzip der molekularen Resistenzbestimmung**

RMP inhibiert die Aktivität der (myko-)bakteriellen RNA-Polymerase, deren Beta-Untereinheit durch das *rpoB*-Gen kodiert wird [95]. Die Mehrzahl der Resistenzen von *M. tuberculosis* gegen RMP entstehen durch „Missense“-Mutationen (Punktmutationen, welche ein Kodon so verändern, dass es für eine andere Aminosäure kodiert) in der hoch-konservierten, 81 Basenpaar langen Genregion der RRDR (engl.: „RMP resistance-determining region“). Die RRDR kodiert die Kodons 507-533 des *rpoB*-Gens (ein Kodon besteht aus einer Sequenz von drei Basenpaaren welche für eine Aminosäure kodiert) [96]. Sehr häufig sind die Kodons Ser531, His526 und Gln513 (diese kodieren jeweils für die Aminosäuren Serin, Histidin und Glutamin) von Mutationen betroffen [97] [96] [98] [99]. Ein RMP resistenter Phänotyp kann durch PCR-Amplifizierung der RRDR und anschließender Sequenzierung einem mutierten Genotyp zugeordnet werden. So können potentielle RMP Resistenzen labortechnisch diagnostiziert werden. Bei *M. leprae* sind ebenfalls Mutationen innerhalb der RRDR, welche die Kodons 401-427 kodiert (äquivalent zu Kodons 507-533 in *M. tuberculosis*), Grundlage für RMP Resistenzen. Besonders Mutationen im Kodon Ser425 (äquivalent zu Ser531 in *M. tuberculosis*) sind für einen Großteil der RMP Resistenzen verantwortlich [100] [95]. Stämme, welche eine/mehrere Mutation(en) innerhalb der RRDR aufweisen und im Tierversuch eine phänotypische RMP Resistenz zeigen, gelten als resistent [94].

Das gleiche Prinzip der RMP Resistenz wurde in *M. ulcerans* im Rahmen eines im Labor durchgeführten Versuchs aufgezeigt. Es wurden dazu innerhalb einer Testreihe *M. ulcerans* infizierte Mäuse mit RMP in Monotherapie behandelt. Drei RMP resistente *M. ulcerans* Stämme konnten isoliert werden. Es wurden Mutationen der Kodons Ser416 und His420 (jeweils äquivalent zu Ser522 und His526 in *M. tuberculosis*) innerhalb der RRDR von *M. ulcerans* festgestellt [101].

### **1.9.3 Bisherige diagnostische Möglichkeiten zur RMP Resistenzbestimmung von *M. ulcerans***

Grundsätzlich kommen derzeit zwei Möglichkeiten zur Rifampicin Resistenzbestimmung von *M. ulcerans* in Betracht. Zunächst existiert die konventionelle Resistenzbestimmung mittels kultureller Anzucht auf Kulturmedien (Löwenstein-Jensen Medium) (z.B. auf Kulturmedien mit und ohne RMP-Anreicherung wodurch anhand der Anzahl wachsender Kolonien Rückschlüsse über die Resistenz erhoben werden können [Proportionsmethode analog zu *M. tuberculosis* [102]]). Jedoch zeichnet sich diese Methode durch lange Inkubationszeiten von mehreren Wochen und eine geringe Sensitivität aus. Dadurch ist die kulturelle Anzucht besonders für klinische Therapieentscheidungen ungeeignet. Eine weitere Möglichkeit stellt die molekulare Resistenzbestimmung mittels PCR Amplifizierung und anschließender Sequenzierung der RRDR dar. Die Detektion von Punktmutationen in der RRDR, für welche eine phänotypische RMP Resistenz vorbeschrieben wurde, erbringt den Resistenznachweis (siehe 1.9.2). Diese Methode wurde von Beissner et al. (Buruli AG der AITM) erstmals im Rahmen einer Pilotstudie anhand klinischer Proben von BUD Patienten aus Ghana getestet, welche zwischen 2004-2007 antibiotisch behandelt wurden. Dabei konnte eine Gesamtzahl von 109 DNA Sequenzen aus Kultur- sowie Gesamt DNA Extrakten sequenziert werden (siehe 1.9.4). Jedoch zeigte sich, dass die Resistenzbestimmung anhand klinischer Proben technisch limitiert. So ergab die Testung klinischer Gesamt DNA Extrakte eine Test-Effizienz (engl.: „overall test efficiency“) von 35,3 %. Dabei zeichnete sich ein signifikanter Unterschied der Effizienz im Vergleich zu Proben aus Kulturmaterial (91,7 %) ab [103].

### **1.9.4 Klinische Verläufe**

Der klinische Verlauf unter antibiotischer Therapie wurde in einigen Studien beschrieben. Der Zeitraum bis zur endgültigen Abheilung der Ulzera zeigte sich in Abhängigkeit von der klinischen Manifestation [47] [85] [104] (Beissner: 15,4 Wochen für Kategorie I, 21,6 Wochen für Kategorie II, 36,6 Wochen für Kategorie III; Nienhuis: 18 Wochen für Kategorie I, 30 Wochen für Kategorie II und III, Sarfo: 8 Wochen für Knötchen, 12 Wochen für Kategorie I, 11 Wochen für Kategorie II, 15,5 Wochen für Kategorie III). Insgesamt zeigen die Ergebnisse verschiedener Studien eine Abheilung von bis zu Zweidrittel der Läsionen nach etwa 25 Wochen nach Therapiebeginn-[105] [86] [85].

Obwohl die initiale Größe der Ulzera den zeitlichen klinischen Verlauf beeinflusst, wurden Fälle beschrieben, in welchen klinisch initial gleich imponierende Ulzera einen unterschiedlichen Heilungsverlauf annehmen [47] [68]. Während einige dieser Ulcera bereits nach wenigen Wochen keine viablen *M. ulcerans* mehr aufwiesen und stetig abheilten, zeigten sich ebenso prolongierte Verläufe, welche auch nach abgeschlossener Chemotherapie noch viable *M. ulcerans* aufwiesen und erst Monate nach abgeschlossener Chemotherapie abheilten (engl.: „slow healers“). In einer Studie durch Sarpong-Duah et al. zeigte sich in 52 % der Ulzera nach Abschluss der antibiotischen Therapie (8 Wochen) und in 10 % nach 16 Wochen weiterhin das Vorliegen viabler *M. ulcerans* durch den 16S rRNA-Viabilitäts-Assay (für 16S rRNA-Viabilitäts-Assay siehe 1.7, „ein Überblick über die aktuelle diagnostische Forschung“). Es zeigten sich in diesen Fällen prolongierte klinische Verläufe (engl.: „slow healers“), die Möglichkeit einer verlängerten antibiotischen Therapie wurde diskutiert [68]. Bei großen Ulzera wurden nach vier Wochen der antibiotischen Therapie progrediente Verläufe beobachtet welche sich klinisch von paradoxen Reaktionen unterschieden sodass ein Therapieversagen angenommen wurde [87]. Bislang wurde keiner der Verdachtsfälle auf das Vorliegen von RMP resistenten *M. ulcerans* Stämmen getestet. Retrospektiv konnte durch Beissner et al. 2010 eine genotypische RMP Resistenz anhand einer Patientenprobe im Rahmen der Pilotstudie festgestellt

werden (eine Punktmutation analog zu Kodon Ser522 bei *M. tuberculosis*, siehe 1.9.2). Der Patient wurde vor der Probenentnahme antibiotisch behandelt. Genaue Informationen über das Therapieregime sind nicht bekannt. Eine Kultur zur phänotypischen Resistenzbestimmung konnte nicht generiert werden [103]. Bislang fehlte es an einem Nachweisverfahren um in den oben genannten Fällen eine zuverlässige und rapide Resistenzbestimmung durchführen zu können, wodurch die aktuelle Resistenzlage von *M. ulcerans* gegenüber RMP in den endemischen BUD Gebieten unbekannt ist (Beissner et al. 2010a) (Jansson et al. 2014).

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Nach Einführung der antimikrobiellen Chemotherapie mit RMP und SM im Jahr 2004 zeigten sich bislang hohe Remissionsraten bei niedrigen Rezidivraten. In Laborexperimenten konnte unter RMP Monotherapie am Mausmodell jedoch die Entstehung von RMP Resistenzen analog dem Resistenzmechanismus von Tuberkulose und Lepra beobachtet werden. Dieser basiert auf Punktmutationen in der „rifampicin resistance determining region“ (RRDR) des *rpoB* Gens, welches die Beta-Untereinheit der (myko-)bakteriellen RNA-Polymerase kodiert. Zuverlässige und schnelle Testverfahren zur routinemäßigen Detektion von RMP resistenten *M. ulcerans* Stämmen sind bislang nicht verfügbar. Der konventionelle Nachweis von RMP resistenten *M. ulcerans* Stämmen durch Kultivierung dauert meist mehrere Wochen. Das molekulare Testverfahren zur Resistenzbestimmung anhand klinischer Proben kann schnell durchgeführt werden und bietet im klinischen Kontext eine geeignete Alternative gegenüber zeitaufwändiger und komplizierter Kultivierung von *M. ulcerans*. Jedoch zeigte der Test an Gesamt DNA Extrakten aus klinischen Proben, welche zuvor durch die IS2404-PCR als *M. ulcerans* positiv getestet wurden, im Rahmen der Pilotstudie eine geringe Test-Effizienz (35,3 %, 55/156) im Vergleich zu Proben aus Kulturmaterial (91,7 %, 88/96), welches aus Gewebeproben oder Wundabstrichen der klinischen Proben aus der Studie gewonnen wurde. Die geringe Test-Effizienz der Gesamt DNA Extrakte aus klinischen Proben kann als größter limitierender Faktor bei der bisher vorliegenden Methode der molekularen Resistenzbestimmung angesehen werden [103].

Der hohe Anteil nicht analysierbarer Proben aus dem Gesamtkollektiv der klinischen Gesamt DNA Extrakte (64,7 %, 101/156) im Vergleich zu Proben aus Kulturmaterial (8,3 %, 8/96) teilt sich in Proben mit negativem *rpoB*-PCR Ergebnis (63,4 %, 64/101) und Proben, welche in der anschließenden Sequenzierung der PCR Amplifikate unspezifische Sequenzen ergaben (36,6 %, 37/101) [103]. Die Abnahme der Proben aus Kulturmaterial erfolgt unter kontrollierten Bedingungen im Labor. Die Abnahme klinischer Proben erfolgt hingegen auf unterschiedliche Weise (Wundabstriche, FNAs, ggf. Stanzbiopsien) aus unterschiedlichen klinischen Manifestationsformen der BUD in verschiedenen Stadien. Der hohe Anteil negativer PCR Ergebnisse an Gesamt DNA Extrakten aus klinischen Proben erklärt sich vermutlich durch die verhältnismäßig geringere Menge von *M. ulcerans* DNA im Vergleich zu Proben aus Kulturmaterial (Anteil PCR-negativer klinischer Proben am Gesamtkollektiv: 41,0 %, 64/156; Kulturmaterial: 6,3 %, 6/96) [103].

Die PCR-positiven Gesamt DNA Extrakte der Pilotstudie ergaben in der Sequenzierung zu 36,6 % (37/101) unspezifische Sequenzen. In dem Assay wurden Mycobacterium-Genus spezifische PCR Primer angewendet, welche an einem konservierten Abschnitt des *rpoB*-Gens binden und dadurch diesen Genabschnitt sämtlicher Mykobakterien amplifizieren [106]. Jedoch befindet sich in den Gesamt DNA Extrakten aus klinischen Proben zusätzlich zur DNA von *M. ulcerans* ebenfalls menschliche DNA sowie DNA einer Vielzahl von Bakterien, welche die Haut bzw. die Wundränder besiedeln. Bei der Probenabnahme sowie DNA Extraktion lässt sich keine Trennung von *M. ulcerans* DNA und anderer DNA durchführen. Die geringe analytische Spezifität des in der Pilotstudie verwendeten Assays ist daher vermutlich durch unspezifische PCR- und Sequenzier-Primer begründet.

Die übergeordnete Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Verbesserung der Test-Effizienz (siehe 3.2.1.2.4) der molekularen RMP Resistenzbestimmung von *M. ulcerans* Gesamt DNA Extrakten aus klinischen Proben. Dieses Ziel sollte durch die Entwicklung eines neuen Assays (hier als **Assay B** bezeichnet) erreicht werden, dessen Test-Effizienz im Anschluss an die Etablierung und Validierung mit dem bisherigen Assay aus der Pilotstudie (hier als **Assay A** bezeichnet) [103] verglichen werden sollte.

**Ziele zur Steigerung der Test-Effizienz des Assays B gegenüber Assay A waren:**

1. Verbesserung der *rpoB*-PCR Positivitätsrate (siehe 3.2.1.2.1) durch den Einsatz einer genaueren, leistungsstärkeren DNA-Polymerase (siehe 3.2.8.1.3).
2. Erhöhung der *rpoB*-PCR Positivitätsrate mittels verbesserter analytischer Spezifität durch *M. ulcerans* spezifische PCR-Primer (siehe 3.2.8.1.1.1 und 3.2.8.2.1).
3. Die Verwendung unterschiedlicher PCR- und Sequenzier-Primer um eine im Sequenzierungsprozess wiederholt fehlerhafte Bindung identischer Primer im Anschluss an die PCR zu verhindern (siehe 3.2.8.1.2).
4. Durch die höhere analytische Spezifität der PCR-Primer die Sequenzierung in Assay B mit einem einzigen Primer durchzuführen, während in Assay A beide PCR-Primer ebenfalls als Sequenzier-Primer eingesetzt wurden (siehe 3.2.8.1.2).
5. Das Herstellen von genauestens quantifizierten Verdünnungsreihen um die analytische Sensitivität (untere Nachweisgrenze) zwischen Assay A und B bestimmen und vergleichen zu können (siehe 3.2.9.1).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Anwendung	Lieferant
Agarose GTQ	Gel-Elektrophorese	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aqua dest.	PCR, Sequenzierung	Carl Roth
Blue Juice 10 x	Gel-Elektrophorese	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Entmineralisiertes Wasser	Gel-Elektrophorese	Anlage im Haus
Ethanol 70 %	DNA-Extraktion, Sequenzierung	Carl Roth
Ethanol 96 %	DNA-Extraktion, Sequenzierung	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Gel Red Nucleic Acid Stain	Gel-Elektrophorese	Biotium, Hayward, USA
HiDi-Formamid	Sequenzierung	Applied Biosystems, Frankfurt, Deutschland
Natriumhypochlorit (NaClO x H <sub>2</sub> O)	Flächenreinigung	Nalgene, Roskilde, Dänemark
Isopropanol (2-Propanal)	DNA-Extraktion	Carl Roth
LiChroSolv. Wasser	Sequenzierung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lysozym 10 mg/ml	DNA Extraktion	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
0.5 % TAE light Puffer	Gel-Elektrophorese	Carl Roth

Tabelle 1: Chemikalien welche im Rahmen der Studie verwendet wurden. In Anlehnung an Huber [107].

### 3.1.2 Nukleotide und Nukleinsäuren

#### 3.1.2.1 In der Studie verwendete Nukleotide und Primer-Sequenzen

Bezeichnung <sup>a</sup>	Sequenz (5'-3') <sup>b</sup>	Anwendung	Hersteller/Lieferant
dNTP's		PCR	Applied Biosystems
100 Bp DNA-Leiter		Gel-Elektrophorese	Invitrogen
MF	CGA CCA CTT CGG CAA CCG	Sense Primer, Assay A PCR und Sequenzierung	TibMolbiol, Berlin, Deutschland
MR	TCG ATC GGG CAC ATC CGG	Antisense Primer, Assay A PCR und Sequenzierung	TibMolbiol
MuB-F	CAT CAC CAG CTC GAC GCT	Sense Primer, Assay B PCR	TibMolbiol
MuB-R	TGG ATC TCG TCG GAA ACG	Antisense Primer, Assay B PCR	TibMolbiol
Bseek-F	AAT ACC TGG TCC GCT TGC	Sense Primer, Assay B Sequenzierung	TibMolbiol
IS2404-TF	AAA GCA CCA CGC AGC ATC T	Sense Primer, qPCR	TibMolbiol
IS2404-TR	AGC GAC CCC AGT GGA TTG	Antisense Primer, qPCR	TibMolbiol
IS2404-TP2	FAM-CCG TCC AAC GCG ATC GGC A-BBQ	Taqman-Sonde, qPCR	TibMolbiol
IS2404 Plasmid Standard		Standardkurve und Positivkontrolle, qPCR	Genexpress, Berlin, Deutschland

**Tabelle 2: Beschreibung der verwendeten Nukleotide und Primer-Sequenzen.**

<sup>a</sup> F, Forward-Primer; R, Reverse-Primer. Die MF und MR Primer wurden im Assay A zur Amplifikation eines 351 Bp langen Fragments genutzt, welches die RRDR enthält und welches durch die MF und MR Primer sequenziert wurde. Die MuB-F und MuB-R Primer wurden im Assay B zur Amplifikation eines 606 Bp langen Fragments genutzt, welches die RRDR enthält die anschließend durch den Bseek-F Primer sequenziert wurde. Die IS2404-TF und IS2404-TR Primer amplifizieren einen Abschnitt der IS2404 Sequenz des *M. ulcerans* und wurden im Rahmen der IS2404-qPCR für die Quantifizierung der Kulturextrakte zur Bestimmung der Nachweisgrenze angewendet. Bei IS2404-TP2 handelt es sich um eine am 5' Ende mit Fluoreszenzfarbstoff (Fluoresceinamidite [FAM]) markierte Taqman-Sonde. Am 3' Ende befindet sich ein Blackberry-Quencher (BBQ), welcher in der Lage ist die Fluoreszenz zu absorbieren. Sobald die Sonde im Rahmen der Amplifikation in die IS2404 DNA eingebaut wurde, wird das Fluoreszenz-Signal nicht mehr absorbiert und kann vom qPCR-Cycler gemessen werden. <sup>b</sup> Primer-Sequenz vom 5' zum 3'-Ende.

#### 3.1.2.2 Im Rahmen der Etablierung des Assay B verwendete Primer

Eine Auflistung der im Rahmen der Etablierung des Assay B entwickelten und getesteten Primer-Paare befindet sich im Anhang (siehe 9.3).

### 3.1.3 Test-Kits

Bezeichnung	Anwendung	Reagenzien/Komponenten	Lieferant
Puregene Core Kit A	DNA Extraktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cell lysis solution</li> <li>- DNA hydration solution</li> <li>- Protein precipitation solution</li> <li>- Proteinase K</li> <li>- Glykogen</li> </ul>	Qiagen, Hilden, Deutschland
KOD Hot Start DNA Polymerase Kit	MuB-F+R PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>- KOD Hot Start DNA Polymerase</li> <li>- MgSO<sub>4</sub> Lösung</li> <li>- 10x PCR Puffer</li> </ul>	Merck
Big Dye Terminator v3.1 Sequencing Kit	Sequenzierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ready Reaction Mix</li> <li>- Sequenzier-Puffer (5X)</li> </ul>	Applied Biosystems
5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (no ROX)	IS2404-qPCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>- HOT FIREPol® DNA Polymerase</li> <li>- 5x Probe qPCR buffer</li> <li>- 15 mM MgCl<sub>2</sub></li> <li>- dNTPs</li> <li>- No ROX dye</li> </ul>	Solis Biodyne, Tartu, Estland
AmpliTaq Gold DNA Polymerase Kit	MF/MR PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>- AmpliTaq Gold DNA Polymerase</li> <li>- MgCl<sub>2</sub> Lösung</li> <li>- PCR Puffer</li> </ul>	Applied Biosystems
Ultrafree-DA Kit	Gel-Extraktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ultrafree-DA Zentrifugen-Filtereinheit</li> </ul>	Merck
Dye Ex 2.0 Spin Kit	Sequenzierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- DyeEx™ 2.0 Spin Filtereinheit</li> <li>- Sammeltubes (2 ml)</li> </ul>	Qiagen

**Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Test-Kits.**

### 3.1.4 Geräte

Bezeichnung	Modell/Seriennummer	Hersteller
Arbeitsbank ClanLaf, steril	VRF 1206	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Drucker	LBP-800	Canon, Krefeld, Deutschland
Gel-Kammer	Model 401216	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Eisflockenbereiter	AF 80 AS, DD6798	Scotsman, Mailand, Italien
Kühlschrank	KT 1414; Model 760024	Liebherr, Biberach, Deutschland
Kühlschrank	KS 155 TA 1F	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Kühlschrank	KG KT RR 16A	Siemens, München, Deutschland
Mikrowelle	8017 E	Privileg
Personal Computer (PC)	/	UniEquip, Martinsried, Deutschland
Pipetten, 10µl	Eppendorf Research® plus	Eppendorf
Pipetten, 20µl, 200µl, 1ml	Pipetman	Gilson, Bad Camberg, Deutschland
Thermocycler	Personalcycler, SN 9707120	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermocycler	UNO II, SR 9707155	Biometra
Thermocycler	CFX 96 Real-Time System	BioRad, München, Deutschland
Thermomixer	MKR 13	HLC, BIOTECH, Deutschland
Tiefkühlschrank	KS155TA	AEG, Nürnberg, Deutschland
Tiefkühlschrank	GP 1456 Mod. 461494	Liebherr
Tiefkühlschrank	GSS 3666	Liebherr
Tiefkühlschrank	GS 15025	Liebherr
Ultraviolet Transilluminator	UT 1150207	UniEquip
Vortex	Assistent Reamix 2789	Reamix, Sondheim, Deutschland
Vortex	Vortex Genie, K-550-GE	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge pico 241715	Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland
Sequenziergerät <sup>a</sup>	ABI3730 automatic sequencer	Applied Biosystems

**Tabelle 4: In der Studie verwendete Geräte. In Anlehnung an Huber [107].**

<sup>a</sup> Die Sequenzierungen wurden am Helmholtz Forschungszentrum (FZ) (Ingolstädter Landstraße 1, 85764 Oberschleißheim, Deutschland) durchgeführt.

### 3.1.5 Labormaterial

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller/Lieferant
Falkon-Gefäße 20ml, 50ml	DNA-Extraktion	Corning, New York, USA
Handschuhe (Safe Skin PFE)	DNA-Extraktion, PCR, Sequenzierung	Kimberly-Clark, Koblenz, Deutschland
Handschuhe (Safe Skin Nitrile)	PCR, Sequenzierung	Kimberly-Clark
Mikroschraubröhrchen 2,0 ml	Transport von diagnostischem Material, DNA-Extraktion	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
Mikro-Tube 0,2 ml	PCR, Sequenzierung	Kisker Biotech
Pipettenspitzen, Safe Seal Tips; 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	DNA-Extraktion, PCR, Sequenzierung	Kisker Biotech
Reaktionsgefäße 1,5 ml	DNA-Extraktion	Kisker Biotech
Gel-Cutter	Sequenzierung	Kisker Biotech
96 Well-Multiplates mit Verschlussfolie	qPCR	BioRad
ABI optical plates	Sequenzierung	Applied Biosystems

**Tabelle 5: In der Studie verwendetes Labormaterial. In Anlehnung an Huber [107].**

### 3.1.6 Mykobakterielle Referenzstämme und diagnostisches Probenmaterial

Bakterienspezies	Herkunft	Material
<i>M. abscessus</i>	NRZ <sup>a</sup>	Humanisolat
<i>M. africanum</i>	NRZ	Humanisolat
<i>M. avium</i>	NRZ	Humanisolat
<i>M. bovis</i>	NRZ	Rindisolat
<i>M. chelonae</i>	NRZ	Humanisolat
<i>M. fortuitum</i>	NRZ	Humanisolat
<i>M. goodii</i>	NRZ	Humanisolat
<i>M. goodii</i>	AITM <sup>b</sup>	Humanisolat
<i>M. kansasii</i>	NRZ	Humanisolat
<i>M. leprae</i>	AITM	Humanisolat
<i>M. malmoense</i>	NRZ	Humanisolat
<i>M. marinum</i>	NRZ	Humanisolat
<i>M. microti</i>	NRZ	Mausisolat
<i>M. scrofulaceum</i>	NRZ	Humanisolat
<i>M. smegmatis</i>	NRZ	Humanisolat
<i>M. szulgai</i>	NRZ	Humanisolat
<i>M. tuberculosis</i>	NRZ	Humanisolat
<i>M. ulcerans</i>	AITM	Humanisolat
<i>M. xenopi</i>	NRZ	Humanisolat
<i>E. coli</i>	MVP <sup>c</sup>	Humanisolat
<i>P. acnes</i>	MVP	Humanisolat
<i>Staph. aureus</i>	MVP	Humanisolat
<i>Staph. epidermidis</i>	MVP	Humanisolat
<i>Str. pyogenes</i>	MVP	Humanisolat

**Tabelle 6: Bakterienspezies zur Spezifitätstestung des Assays B.**

<sup>a</sup> NRZ: Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien, Borstel; <sup>b</sup> AITM: Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin an der medizinischen Klinik und Poliklinik IV des Klinikums der Universität München (LMU); <sup>c</sup> MVP: Max von Pettenkofer-Institut, München.

<i>M. ulcerans</i> Stamm	Herkunft	Material
K5D	Kamerun	Humanisolat

**Tabelle 7: *M. ulcerans* Kultur.**

Zur Etablierung und technischen Validierung von Assay B sowie zur Herstellung von quantifizierten Verdünnungsreihen verwendet.

Proben ID	Herkunft der Probe	FNA	Stanzbiopsie	Wundabstrich
T/159FNA	T <sup>a</sup>	X		
T/159 P	T		X	
T/159 S	T			X
T/197S	T			X
Summe	/	1	1	2

**Tabelle 8: IS2404-PCR negative klinische Gesamt DNA Extrakte.**

Für den Test der Spezifität anhand klinischer Proben zur Etablierung von Assay B verwendet (siehe 4.1.2.1.1). <sup>a</sup>T: Togo.

Proben ID	Herkunft der Probe	Wundabstrich	Stanzbiopsie	Kulturextrakt
NK/PA/016/06/N/DT/P	G <sup>a</sup>		X	
NK/PA/016/06/N/DT/CST	G			X
A/KS/194/06/N/DT/P	G		X	
A/VY/193/06/N/DT/S	G	X		
A/HN/264/07/N/DT/S	G	X		
NK/PA/016/06/N/DT/P	G		X	
NK/PA/016/06/N/DT/CST	G			X
NK/SI/034/06/N/DT/S	G	X		
A/YA/205/06/R/DT/S	G	X		
NK/RA/008/06/N/DT/S	G	X		
A/EN/189/06/N/DT/P	G		X	
A/AN/247/07/N/DT/P+CST	G		X	
Summe	/	5	5	2

**Tabelle 9: IS2404 PCR positive klinische Gesamt DNA Extrakte die in der Pilotstudie entweder negative oder kontaminierte Ergebnisse ergaben.**

Die Proben wurden mittels Assay B erneut getestet (siehe 3.2.9.2.1). <sup>a</sup>G: Ghana.

Proben ID	Herkunft der Probe	Feinnadelbiopsie	Stanzbiopsie	Wundabstrich
T/169FNA	T <sup>a</sup>	X		
T/169P	T		X	
T/173FNA	T	X		
T/173P	T		X	
T/174P	T		X	
T/178FNA	T	X		
T/178P	T		X	
T/178S	T			X
T/179FNA	T	X		
T/179P	T		X	
T/184FNA	T	X		
T/184P	T		X	
T/186FNA	T	X		
T/186P	T		X	
T/187FNA	T	X		
T/189FNA	T	X		
T/189P	T		X	

T/190FNA	T	X		
T/190P	T		X	
T/192P	T		X	
T/192S	T			X
T/193FNA	T	X		
T/193P	T		X	
T/193S	T			X
T/194P	T		X	
T/195FNA	T	X		
T/195P	T		X	
T/195S	T			X
T/196P	T		X	
T/196S	T			X
T/198FNA	T	X		
T/198P	T		X	
T/199P	T		X	
T/201FNA	T	X		
T/201P	T		X	
T/202FNA	T	X		
T/202S	T			X
T/202P	T		X	
T/204FNA	T	X		
T/205FNA	T	X		
T/205P	T		X	
T/206FNA	T	X		
T/206P	T		X	
T/208FNA	T	X		
T/214FNA	T	X		
T/214S	T			X
T/215FNA	T	X		
T/221S	T			X
T/226S	T			X
T/231S	T			X
T/236S	T			X
G.A.P.002S	G <sup>b</sup>			X
G.A.P.007S	G			X
G.A.P.010S	G			X
G.A.P.014S	G			X
G.A.P.015S	G			X
G.A.P.016S	G			X
G.A.P.017S	G			X
G.A.P.019S	G			X
G.A.P.026S	G			X
T.T.P.501_S2	T			X
T.T.P.504_S2	T			X

T.T.P.504_F2	T	X		
T.T.P.510_S3	T			X
T.T.P.511_S3	T			X
T.T.P.514_S2	T			X
T.T.P.514_F2	T	X		
T.T.P.520_S3	T			X
T.T.P.522_S1	T			X
T.T.P.522_S2	T			X
T.T.P.526_S2	T			X
T.T.P.530_S2	T			X
T.T.P.531_S2	T			X
T.T.P.537_S1	T			X
T.T.P.537_F2	T	X		
T.T.P.540_S1	T			X
T.T.P.544_S1	T			X
T.T.P548_S3	T			X
T.T.P549_S1	T			X
T.T.P549_S2	T			X
T.T.P549_S3	T			X
T.T.P550_S1	T			X
T.T.P550_S2	T			X
T.T.P.550_S3	T			X
T.T.P.625_S3	T			X
T.T.P.627_S3	T			X
T.T.P.634_S3	T			X
T.T.P.641_S2	T			X
T.T.P.654_S3	T			X
T.T.P.661_S3	T			X
T.T.P.670_S3	T			X
T.T.P.675_S2	T			X
T.T.P.675_S3	T			X
T.T.P.682_S2	T			X
T.T.P.690_S2	T			X
T.T.P.690_S3	T			X
T.T.P.701_S2	T			X
T.T.P.701_S3	T			X
T.T.P.723_S2	T			X
T.T.P.723_S3	T			X
T.T.P.739_S2	T			X
T.T.P.741_S2	T			X
T.T.P.741_S3	T			X
T.T.P.742_S2	T			X
T.T.P.742_S3	T			X
T.T.P.751_S2	T			X
T.T.P.500_F2	T	X		

T.T.P.502_F2	T	X		
T.T.P.503_F2	T	X		
T.T.P.505_F2	T	X		
T.T.P.505_P2	T		X	
T.T.P.509_F2	T	X		
T.T.P.513_F2	T	X		
T.T.P.515_F2	T	X		
T.T.P.515_P2	T		X	
T.T.P.517_F1	T	X		
T.T.P.521_F1	T	X		
T.T.P.521_F2	T	X		
T.T.P.525_F1	T	X		
T.T.P.525_F2	T	X		
T.T.P.529_F2	T	X		
T.T.P.543_F1	T	X		
T.T.P.543_F2	T	X		
T.T.P.543_P2	T		X	
T.T.P.626_F2	T	X		
T.T.P.630_F2	T	X		
T.T.P.507_P2	T		X	
T.T.P.528_P2	T		X	
T.T.P.534_P2	T		X	
T.T.P.535_P1	T		X	
T.T.P.536_P1	T		X	
T.T.P.539_P1	T		X	
T.T.P.542_P1	T		X	
Summe		40	30	63

**Tabelle 10: IS2404-PCR positive klinische Gesamt DNA Extrakte vor Beginn antimikrobieller Therapie.**  
Die Proben wurden für den Vergleich zwischen Assay A und B herangezogen (siehe 3.2.9.2). <sup>a</sup>T: Togo; <sup>b</sup>G: Ghana.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Begriffsdefinitionen

#### 3.2.1.1 Spezifität und Sensitivität

##### 3.2.1.1.1 Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität bezeichnet die Fähigkeit eines analytischen Assays nur die zu identifizierende Zielsubstanz nachzuweisen (Saah and Hoover 1997). Im Fall einer PCR/Sequenzierung beschreibt die analytische Spezifität die Fähigkeit der PCR/Sequenzierungs Primer ausschließlich an den gewählten DNA-Abschnitt im Ziel-Gen zu binden und diesen zu amplifizieren. Die analytische Spezifität wurde wie unter 3.2.8.2.1 beschrieben für die *rpoB*-PCR von Assay B bestimmt.

##### 3.2.1.1.2 Analytische Sensitivität (untere Nachweisgrenze)

Die analytische Sensitivität (Synonym: untere Nachweisgrenze, engl.: „lower limit of detection“) bezeichnet die Fähigkeit eines Assays eine niedrige Konzentration einer Substanz in einer biologischen Probe nachweisen zu können. Je niedriger die detektierbare Konzentration ist, desto größer ist die analytische Sensitivität [108]. Die analytische Sensitivität wurde wie unter 3.2.9.1 beschrieben für die *rpoB*-PCRs der Assays A und B bestimmt.

##### 3.2.1.1.3 Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität bezeichnet die Fähigkeit eines Assays einen nicht erkrankten Patienten als gesund zu identifizieren, und diesen somit als „richtig negativ“ zu klassifizieren. Sie ergibt sich aus dem Quotienten der richtig negativ getesteten Patienten und den insgesamt negativen Patienten (bestehend aus den richtig negativ getesteten und falsch positiv getesteten) [108]. Da die im Folgenden beschriebene Testung an klinischen Proben keine negativen Proben beinhaltet, konnte die diagnostische Spezifität der PCR Assays nicht ermittelt werden.

##### 3.2.1.1.4 Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität bezeichnet die Fähigkeit eines Assays z.B. eine Erkrankung in der Bevölkerung nachweisen zu können, einen Patienten also als „richtig positiv“ zu klassifizieren. Sie ergibt sich aus dem Quotienten der richtig positiv getesteten Patienten und den insgesamt positiven Patienten (bestehend aus den richtig positiv getesteten und falsch negativ getesteten) [108]. Die diagnostische Sensitivität der *rpoB*-PCR wurde für beide Assays bestimmt und entspricht der *rpoB*-PCR Positivitätsrate (siehe 3.2.1.2.1).

#### 3.2.1.2 Definitionen der Test-Parameter für den Vergleich der Assays A und B an klinischen Proben

Die Durchführung des Vergleichs der Assays anhand klinischer Proben ist unter 3.2.9.2.2 beschrieben.

##### 3.2.1.2.1 Die *rpoB*-PCR Positivitätsrate

Der Anteil an Proben mit einem positiven Ergebnis in der *rpoB*-PCR, welcher als wichtigster Test-Parameter der PCR herangezogen wurde (Die *rpoB*-PCR Positivitätsrate entspricht in diesem Fall der diagnostischen Sensitivität der *rpoB*-PCR).

##### 3.2.1.2.2 PCR-Inhibitionsrate

Der Anteil an klinischen Proben, welche in der PCR unverdünnt durch Inhibition zu einem negativen Ergebnis führten.

#### 3.2.1.2.3 Die *rpoB*-sequencing Positivitätsrate

Der Anteil der PCR positiven Proben, welcher in der anschließenden Sequenzierung ein definitives Sequenzierergebnis ergab, wurde als wichtigster Test-Parameter der Sequenzierung herangezogen.

#### 3.2.1.2.4 Die Test-Effizienz

Der Anteil der Proben mit einem positiven (auswertbaren) PCR und Sequenzierergebnis aus allen getesteten Proben. Die Test-Effizienz wurde als globaler Test-Parameter für den jeweiligen Assay verwendet.

### 3.2.2 Ethische Voraussetzungen

Das Einverständnis der nationalen Ethikkommission Togos (“Comité de Bioéthique pour la Recherche en Santé”) der Universität zu Lomé (14/2010/CBRS) wurde erteilt und die Studie wurde vom Gesundheitsministerium in Togo genehmigt (Ref. No. 0009/2011/MS/DGS/DPLET). Das Einverständnis zur Verwendung der Proben aus Ghana wurde von der ghanaischen Ethikkommission der Kwame Nkrumah University of Science and Technology erteilt (CHRPE/07/01/05).

### 3.2.3 Ein- und Ausschluss Kriterien

Voraussetzung für die Verwendung sämtlicher Proben von klinischen BUD-Verdachtsfällen war das Einverständnis der Patienten zur Probenabnahme, Datenerfassung, Datenarchivierung und deren weiterer Verwendung. Des Weiteren wurden ausschließlich Proben einbezogen, welche bereits im Vorfeld durch die standardmäßig zur diagnostischen Verdachtsbestätigung eingesetzte IS2404-PCR als *M. ulcerans* positiv oder negativ getestet wurden. Darüber hinaus wurden keine weiteren Faktoren (z.B. Erkrankungsdauer, Krankheitsausprägung bezüglich Anzahl der Läsionen, Alter oder Geschlecht der Patienten) berücksichtigt. Fehlendes Einverständnis der Patienten bzw. der gesetzlichen Vertreter waren Ausschlusskriterien.

### 3.2.4 DNA Extrakte von *M. ulcerans* Kulturen und klinischen Proben

#### 3.2.4.1 Nukleinsäurepräparation aus Kulturmaterial

Das Kulturextrakt stammte aus den in der AITM vorhandenen Kulturen aus Kamerun [109]. Die Gesamt DNA Extraktion aus Kulturmaterial fand gemäß des Protokolls „Extraction of mycobacterial DNA from clinical specimens“ statt, basierend auf dem „Puregene Core Kit A“ von Qiagen (siehe 3.1.3) [69]. Das Material wurde von der in der AITM befindlichen Kultur K5D aus Kamerun, welche aus einer im Februar 2009 generierten Subkultur entstammt, abgenommen. Sämtliche Reagenzien exklusive Lysozym, Isopropanol und Ethanol 70 % waren im „Puregene Core Kit A“ von Qiagen enthalten (siehe 3.1.3). Die Anleitung zur Nukleinsäurepräparation befindet sich im Anhang (siehe 9.1).

#### 3.2.4.2 Art und Herkunft der klinischen Proben

Die Gesamt DNA Extrakte von Patientenproben kamen aus Togo und aus Ghana und wurden einerseits im Rahmen des von der Europäischen Union geförderten BURULICO Projektes (Projektnummer: INCO-CT-2005-015476-BURULICO) [52], zum anderen im Rahmen des BuruliVac Projektes der Europäischen Union (Projektnummer: 241500) abgenommen. Die Nukleinsäurepräparation der klinischen Proben, die Testung mittels IS2404-PCR sowie die Zuweisung der Proben ID wurde bereits im Rahmen dieser Projekte geleistet. Im Rahmen dieser Studie wurde mit freundlicher Genehmigung der Buruli AG des AITM auf diese Vorarbeit zurückgegriffen. Es wurden für den direkten Vergleich der Assays A und B sowohl DNA Extrakte aus Wundabstrichen ( $n = 63$ ), als auch Feinnadelbiopsien (FNA) ( $n = 40$ ) und 3-mm Stanzbiopsien ( $n = 30$ ) verwendet (siehe Tabelle 10, 3.1.6).

### **3.2.4.3 Konservierung der Proben**

Die Kurzzeitlagerung der DNA Extrakte erfolgte bis zu max. 7 Tage in 2 ml Schraubröhrchen im Kühlschrank bei 4 °C. Die Langzeitlagerung von Wochen bis Jahren erfolgte in 2 ml Schraubröhrchen bei –20 °C.

### **3.2.5 Datenerfassung und –archivierung**

Die Daten bezüglich der Etablierung und Validierung des Assays B befinden sich in ausgedruckter Form im Archiv der AITM. Die verwendeten Patientenproben wurden anhand der Proben ID (siehe Tabelle 10, 3.1.6) in einer Liste erfasst. Die Liste wurde gemäß den Ergebnissen des Vergleichs von Assay A und Assay B weitergeführt und auf den Servern der AITM archiviert.

### **3.2.6 Angewendete Labormethoden zum Nachweis der RRDR von *M. ulcerans***

#### **3.2.6.1 PCR-Diagnostik und Agarose Gel-Elektrophorese**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde in Assay A und B zur Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen, welche jeweils die RRDR beinhalten, eingesetzt (siehe 3.2.6.1.1, 3.2.6.1.2). Das so erzeugte DNA-Amplifikat wurde mittels Agarose Gel-Elektrophorese detektiert (siehe 3.2.6.1.4) und aus dem Agarose Gel mittels Gel-Cuttern entnommen. Es folgte die Aufreinigung des DNA-Amplifikats mittels Filter-Tubes (Ultrafree-DA Zentrifugen-Filtereinheiten) (siehe 3.2.6.1.5):

##### **3.2.6.1.1 PCR-Diagnostik Assay A**

Die konventionell durchgeführte MF/MR-PCR des Assay A amplifiziert im DNA Extrakt der zu analysierenden Patientenprobe ein 351 Bp langes Fragment des *rpoB*-Gens welches die im Anschluss zu sequenzierende RRDR einschließt (Beissner M, 2010). Zusammensetzung des Reaktionsendvolumens (20 µl) für eine MF/MR PCR-Reaktion:

H<sub>2</sub>O (10 µl), PCR Puffer (2,0 µl, 100 mM Tris-HCL, 500 mM KCL, pH 8,3), MgCl<sub>2</sub> (2 µl, 25 mM), Desoxynukleosidtriphosphat-Mix (dNTPs) (1.6 µl, 800 µM), Primer MF (Sequenz 5`-3`: CGA CCA CTT CGG CAA CCG, 1 µl, 10 µM) und MR (Sequenz 5`-3`: TCG ATC GGG CAC ATC CGG, 1 µl, 10 µM), AmpliTaq Gold DNA Polymerase (0.2 µl, 5 U/µl), 2 µl der klinischen Gesamt DNA Extrakte.

Die Amplifikation im Thermocycler wurde wie folgt durchgeführt:

Die initiale Denaturierungsphase betrug 5 min bei 95 °C, dann folgten 37 Zyklen: Denaturierung (95 °C, 15 sec), Primeranlagerung (56 °C, 10 sec, engl.: „annealing“) und Extension (72 °C, 30 sec, engl.: „elongation“). Die Reaktion war nach terminaler Extensionsphase (72 °C, 5 min) beendet, die Endtemperatur betrug 8 °C.

##### **3.2.6.1.2 PCR-Diagnostik Assay B**

Die Etablierung und Validierung des Assay B ist im Abschnitt 3.2.8 beschrieben. Die konventionell durchgeführte MuB-F+R-PCR des Assay B amplifiziert im DNA Extrakt der zu analysierenden Patientenprobe ein 606 Bp langes Fragment des *rpoB*-Gens, welches die im Anschluss zu sequenzierende RRDR einschließt. Zusammensetzung des Reaktionsendvolumens (20 µl) für eine MuB-F+R-PCR-Reaktion:

H<sub>2</sub>O (11,2 µl), 10x PCR Puffer für KOD Hot Start DNA Polymerase (2,0 µl), MgSO<sub>4</sub> (1,2 µl, 25 mM), dNTPs (2,0 µl, 800 µM), Primer Mub-F (Sequenz 5`-3`: CAT CAC CAG CTC GAC GCT, 0.6 µl, 10 µM) und Mub-R (Sequenz 5`-3`: TGG ATC TCG TCG GAA ACG, 0.6 µl, 10 µM), KOD Hot Start Polymerase (0.4 µl, 1 U/µl), 2 µl der klinischen Gesamt DNA Extrakte.

Die Amplifikation im Thermocycler wurde wie folgt durchgeführt:

Die initiale Denaturierungsphase betrug 2 min bei 95 °C, dann folgten 39 Zyklen: Denaturierung (95 °C, 20 sec), Primeranlagerung (63 °C, 10 sec) und Extension (70 °C, 15 sec). Die Reaktion war nach terminaler Extensionsphase (72 °C, 5 min) beendet, die Endtemperatur betrug 8 °C.

#### 3.2.6.1.3 Interne Qualitätskontrolle

Die Durchführung jeder PCR wurde zur Qualitätssicherung mit jeweils einer Negativkontrolle (an Stelle von 2 µl Probematerial wurden 2 µl destilliertes Wasser als Template eingesetzt), Positivkontrolle (Template-Kontrollen aus Kulturextrakten der Kultur K5D) sowie Inhibitionskontrolle (Template aus Kulturextrakten + klinische Probe im Verhältnis 1 : 1) kombiniert. Ein positives PCR Ergebnis der Negativkontrolle wurde als Beweis für Kontamination der Proben gewertet. Das positive PCR Ergebnis der Positivkontrolle wurde als Beweis eines erfolgreichen PCR Ablauf gewertet. Ein negatives PCR Ergebnis der Inhibitionskontrolle wurde als Beweis gewertet, dass in der jeweiligen Probe eine signifikante Menge an PCR-Inhibitoren enthalten war, ein positives PCR Ergebnis der Inhibitionskontrolle zeigte die Abwesenheit von PCR-Inhibitoren.

#### 3.2.6.1.4 Agarose Gel-Elektrophorese und Isolierung der PCR-Amplifikate

Nach abgelaufener PCR wurden die PCR-Produkte unter Verwendung von Gelladepuffer (Blue Juice 10 x) (Mischverhältnis: 7 µl PCR-Amplifikat zu 2 µl Gelladepuffer) auf ein mit Gel-Red angereichertes, 1,5 %-iges Agarose Gel aufgetragen. Die Separation der PCR-Amplifikate erfolgte bei einer Spannung von 90 Volt für 45 min. Anschließend wurden die aufgetrennten PCR-Amplifikate unter UV-Licht als distinkte DNA-Banden sichtbar gemacht. Unter Analyse mittels einer DNA Leiter wurden DNA-Banden bei 492 Bp (Assay A) oder 606 Bp (Assay B) als positives PCR Ergebnis gewertet.

#### 3.2.6.1.5 Isolierung, Aufreinigung und Konservierung der Ziel-DNA

Die unter 3.2.6.1.4 beschriebenen fluoreszierenden DNA-Banden wurden unter UV-Licht mittels sterilen Gel-Cuttern aus dem Gel geschnitten und jeweils in eine Ultrafree-DA Zentrifugen-Filtereinheit übergeführt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Zentrifugation (10 Minuten bei 5000 g), das aufgereinigte DNA-Amplifikat wurde in Mikroschraubröhrchen (2,0 ml) isoliert. Das aufgereinigte DNA-Amplifikat konnte bei 8 °C für ca. zwei Wochen bzw. -20 °C für mehrere Monate gelagert werden.

### **3.2.6.2 Sequenzierung der PCR-Amplifikate**

Die Sequenzierung der aufgereinigten DNA-Amplifikate erfolgte im ersten Schritt mittels Cycle-Sequencing (siehe 3.2.6.2.1). Im Anschluss folgte die Aufreinigung des Cycle-Sequencing Produkts (siehe 3.2.6.2.2, 3.2.6.2.3), die aufgereinigten DNA-Sequenzen wurden durch das Sequenziergerät (ABI3730 automatic sequencer) im Helmholtz FZ ausgewertet (siehe 3.2.6.2.4):

#### 3.2.6.2.1 Cycle-Sequencing

Das Cycle-Sequencing ähnelt dem Ablauf einer konventionellen PCR-Reaktion, wobei im dNTP-Mix zusätzlich Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) enthalten sind, welche zu einem DNA-Kettenabbruch führen und durch farbliche Kodierung (Fluoreszenz-Markierung) anschließend vom ABI3730 automatic sequencer erkannt werden können. Zusammensetzung des Reaktionsendvolumens (5 µl) für eine Cycle-Sequencing-Reaktion:

2 µl DNA-Amplifikat, 1,5 µl Sequenzier-Puffer, 1 µl Primer (Assay A: Pro klinischer Probe wurden zwei Cycle-Sequencing Reaktionen mit jeweils dem MF und MR Primer durchgeführt [Doppelansatz]; Assay

B: Es wurde pro klinischer Probe jeweils eine Cycle-Sequencing Reaktion mit dem Bseek-F Primer durchgeführt [Einfachansatz]), 0,5 µl Ready Reaction Mix.

Das Cycle-Sequencing Programm wurde in einem Thermocycler nach folgendem Protokoll durchgeführt:

25 Zyklen: Denaturierung (95 °C, 30 sec), Primeranlagerung (50 °C, 15 sec) und Extension (60 °C, 4 min). Die Reaktion war nach terminaler Extension beendet, die Endtemperatur betrug 8 °C.

#### 3.2.6.2.2 Aufreinigung des Cycle-Sequencing DNA-Produktes

Die Aufreinigung der DNA-Produkte der Sequenzier-Reaktion zur Entfernung überschüssiger ddNTP's, dNTP's und Salze erfolgte mittels „Dye Ex 2.0 Spin Kit“ von Qiagen gemäß Hersteller-Protokoll. Die verwendeten Dye Ex Filter exklusive 2 ml Eppendorf-Tubes waren im Kit enthalten. Der ausführliche Vorgang ist im Anhang beschrieben (siehe 9.2).

#### 3.2.6.2.3 Fällung, Eluierung und Befüllung der „Optical Plates“

Die Ethanol-Fällung erfolgte mittels Zuführung von zunächst 97 %igem Ethanol, gefolgt von zweimaliger Zuführung von 70 %igem Ethanol in Verbindung mit Zentrifugation und anschließendem Trocknen des Produktes der Sequenzier-Reaktion. Die Eluierung erfolgte mittels 12 µl LiChroSolv. Wasser und 13 µl HiDi-Formamid. Das Endvolumen von 25 µl pro Reaktion wurde in ABI optical plates überführt. Die Auswertung erfolgte im Helmholtz FZ. Zeitgleich wurde nach Vorlage eine Auflistung mit den ID-Nummern der Proben erstellt und per Email ans Helmholtz FZ gesendet. Der ausführliche Vorgang ist im Protokoll „Cycle-Sequencing am ABI 3730“ beschrieben und befindet sich im Anhang (siehe 9.2).

#### 3.2.6.2.4 Auswertung der Sequenzen

Die Sequenzierung erfolgte nach Eingang der Proben durch das Personal im Helmholtz FZ innerhalb weniger Werktage. Die ermittelten Sequenzen wurden im Anhang per Email vom Helmholtz FZ zurückgesendet. Die Auswertung erfolgte mit der Software DNASIS Max (MiraiBio, San Francisco, CA) im AITM. Zunächst wurde überprüft, ob ein positives Sequenzierergebnis vorlag. Als negatives Ergebnis wurde das Fehlen von Sequenzen gewertet. Als unspezifisch wurde das Ergebnis gewertet, wenn die Sequenzen überlagert waren oder einer anderen Bakterienspezies als *M. ulcerans* zugeordnet werden konnten. Ein positives Ergebnis lag vor, wenn die Sequenzen dem *M. ulcerans* Wildtyp entsprachen. Dazu wurden die Sequenzen mit der Sequenz der RRDR des *M. ulcerans* Stamms Agy99 (GenBank Nummer CP000325) verglichen.

### 3.2.7 Assay A

Assay A wurde wie von Beissner et al. 2010 [103] beschrieben angewendet. Die genauen Abläufe sind unter PCR-Diagnostik Assay A (3.2.6.1.1), Sequenzierung der PCR-Amplifikate (3.2.6.2), Bestimmung der Nachweisgrenze (3.2.9.1) und Vergleich anhand klinischer Proben (3.2.9.2) beschrieben.

### 3.2.8 Assay B

#### 3.2.8.1 Etablierung von Assay B

##### 3.2.8.1.1 Design der PCR-Primer

Im Rahmen der Primer-Entwicklung wurde zunächst nach den unter 3.2.8.1.1.1 und 3.2.8.1.1.2 beschriebenen Methoden ein Primer-Paar ausgewählt und im Rahmen der Etablierung und Validierung

getestet (siehe 3.2.8.1.4, 3.2.8.2). Bei Erfüllung definierter Ausschlusskriterien wurde das Primer-Paar verworfen und eine neue Testreihe wurde begonnen.

#### 3.2.8.1.1.1 Bestimmung der Primer Spezifität anhand einer *in siliko* Analyse

Die MF und MR Primer der Pilotstudie liegen in einem hoch konservierten Gen-Abschnitt des mykobakteriellen *rpoB*-Gens [106], welches die RRDR umschließt. Potentielle PCR-Primer in diesem Abschnitt sind aufgrund dieser Tatsache als Mykobakterien-Genus spezifisch anzusehen. Von Lee et al. wurde 2003 ein polymorpher Gen-Abschnitt für Mykobakterien innerhalb des *rpoB*-Gens beschrieben, welcher im Upstream-Bereich der RRDR liegt [110]. Zur Entwicklung *M. ulcerans* spezifischer PCR-Primer wurde dieser Gen-Abschnitt als potentielle Bindungsstelle für den Forward-Primer des Assays B gewählt. Zur vergleichenden graphischen Darstellung des polymorphen Gen-Abschnitts wurde zunächst eine Auswahl potenziell kontaminierender (myko-) bakterieller Spezies getroffen, welche einerseits anhand von Beschreibungen phylogenetischer Ähnlichkeiten innerhalb der Familie der Mykobakterien [106] [111] [112] und zum anderen anhand der Verfügbarkeit ihrer *rpoB*-Gen Sequenzen im Datenkollektiv von GenBank (PubMed, NCBI) ausgewählt wurden (siehe Tabelle 11). Diese Gensequenzen wurden mit Hilfe des Computer-Programmes DNASIS Max graphisch dargestellt (engl.: „alignment“), um die Unterschiede der DNA Sequenz der verschiedenen (Myko-) Bakterien in dieser Gen-Region zu vergleichen und die selektive Suche nach einer geeigneten Bindungsstelle für einen möglichst *M. ulcerans* spezifischen Forward-Primer durchzuführen. Somit wurde der Fokus bei der Entwicklung eines geeigneten Forward-Primers auf möglichst hohe Spezifität, für den Reverse-Primer auf thermodynamische Kompatibilität mit dem Forward-Primer gesetzt (siehe 3.2.8.1.1.2). Die Spezifität der PCR-Primer gegenüber verwandter, in den Vergleich eingebrachter mykobakterieller DNA wurde durch das Abweichen von mindestens drei Basenpaaren innerhalb der Primersequenz definiert.

Bakterienspezies	GenBank Accession number
<i>M. abscessus</i>	AY271329
<i>M. africanum</i>	AY271330
<i>M. avium</i>	AY271322
<i>M. bovis</i>	AY271323
<i>M. celatum type I</i>	AY271337
<i>M. celatum type II</i>	AY271326
<i>M. fortuitum I</i>	AY271325
<i>M. gordonae</i>	AY271342
<i>M. haemophilum</i>	AY271331
<i>M. kansasii type I</i>	AY271333
<i>M. kansasii type II</i>	AY271334
<i>M. kansasii type IV</i>	AY271335
<i>M. malmoense</i>	AY271321
<i>M. marinum</i>	AY271318
<i>M. microti</i>	AY271315
<i>M. peregrinum</i>	AY271324
<i>M. scrofulaceum</i>	AY271317
<i>M. smegmatis</i>	AY271345
<i>M. szulgai</i>	AY271319
<i>M. ulcerans</i>	CP000325

**Tabelle 11: Übersicht der Mykobakterien, anhand welcher die in siliko Analyse der polymorphen Genregion durchgeführt wurde.**

Da die PCR an klinischen Proben durchgeführt wurde, welche zusätzlich große Mengen menschlicher und nicht-mykobakterieller DNA enthalten, wurden die Primer mit dem webbasierten Programm Primer-BLAST des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) auf Sequenzhomologien untersucht [113]. Starke Übereinstimmungen ( $\leq 3$  Bp Unterschied zu sowohl Forward- als auch Reverse-Primer) der Primer mit menschlicher oder bakterieller DNA anderer Spezies galten als Ausschlusskriterien für den Einsatz in Assay B.

#### 3.2.8.1.1.2 Thermodynamische Eigenschaften der Primer

Die Suche nach einem geeigneten Forward-Primer innerhalb des polymorphen Gen-Abschnittes „upstream“ der RRDR und eines geeigneten Reverse-Primers „downstream“ der RRDR wurde mit Hilfe des webbasierten Programms Primer3 [114] [115] durchgeführt. Die thermodynamischen Parameter beim Primer Design stützen sich im Wesentlichen auf die Eigenschaften der Primer aus der Pilot-Studie [106] [103]. Die folgenden Parameter wurden bei der Suche im Menu von Primer3 festgelegt: Primerlänge zwischen 17 und 19 Bp, maximale Schmelztemperatur  $< 63$  °C, Differenz der Schmelztemperatur zwischen dem Forward- und Reverse-Primer  $< 2$  °C, CG Gehalt (Das Verhältnis der Basen Cytosin und Guanin zu Adenin und Thymin)  $< 80$  %, maximale Länge des Amplifikats (engl.: „product size“)  $< 700$  Bp, „Max Self Complementarity“ (Score für die Fähigkeit zweier identischer Primer eine DNA-Doppelstrangbindung einzugehen): 8, „Max 3' Self Complementarity“ (Score für die Fähigkeit zweier identischer Primer eine DNA-Doppelstrangbindung vom 3'-Ende aus beginnend einzugehen und somit nicht mehr effektiv zu sein oder fehlerhafte DNA-Amplifikate zu erzeugen): 3, „Max Pair Complementarity“ (Score für die Fähigkeit zweier unterschiedlicher Primer eine DNA-Doppelstrangbindung einzugehen): 8, „Max 3' Pair Complementarity“ (Score für die Fähigkeit zweier unterschiedlicher Primer eine DNA-Doppelstrangbindung vom 3'-Ende aus beginnend einzugehen): 3.

Primer-Paare mit thermodynamischen Eigenschaften außerhalb dieser Parameter erfüllten die Ausschlusskriterien.

#### 3.2.8.1.2 Design des Sequenzier-Primers

Auswahlkriterien des Sequenzier-Primers waren eine Bindungsstelle in der nahegelegenen Upstream-Region der RRDR, welche durch diesen sequenziert werden sollte, und günstige thermodynamische Eigenschaften (siehe 3.2.8.1.1.2). Da die nahegelegene Upstream-Region der RRDR innerhalb der konservierten Region des *rpoB*-Gens liegt ist das Design eines *M. ulcerans* spezifischen Sequenzier-Primers in dieser Region nicht realisierbar. Jedoch wurde die *M. ulcerans* Spezifität des Sequenzier-Primers als nebensächlich betrachtet, da die *M. ulcerans* Spezifität durch den PCR Forward-Primer erreicht werden sollte.

#### 3.2.8.1.3 Auswahl der Polymerase

Um eine möglichst hohe Effizienz und Spezifität für Assay B zu gewährleisten wurde die *Thermococcus kodakaraensis* (KOD) Hot Start Polymerase angewendet. Diese hat im Vergleich zur *Thermus aquaticus* (Taq) Polymerase des Assays A eine etwa doppelt so hohe Elongationsrate (106-138 Basen/sec. bei der KOD Hot Start Polymerase gegenüber 61 Basen/sec. bei der Taq Polymerase) und eine erheblich gesteigerte Genauigkeit (engl: „mutation frequency“, 0,1 % bei der KOD Hot Start Polymerase gegenüber 5,1 % bei der Taq Polymerase) [116] [117]. Die „mutation frequency“ gibt den prozentualen Anteil von phänotypischen Mutationen an, welche im Rahmen der PCR-Amplifikation durch DNA Mutationen auftreten. Je höher die „mutation frequency“, desto niedriger die Genauigkeit.

3.2.8.1.4 In vitro Testung der Primer anhand von Kulturmaterial und Optimierung des PCR-Protokolls  
Zum in vitro Test der in siliko ausgewählten PCR-Primer Paare wurden diese zunächst anhand von Proben aus *M. ulcerans* DNA Extrakten aus Kulturmaterial getestet (siehe 3.2.4.1). Während die Temperaturen und die Zeit-Intervalle in der PCR für die Schritte der Denaturierung und Elongation nach dem Standardprotokoll der KOD Hot Start Polymerase durchgeführt wurden (siehe 3.2.6.1.2), ist die benötigte Temperatur für den Schritt der Primeranlagerung von der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer abhängig und musste individuell angepasst werden. Die wahre Schmelztemperatur kann aufgrund der Zusammensetzung des angewendeten PCR Kits von der im Voraus in silico berechneten Schmelztemperatur um mehrere Grad Celsius abweichen. Es wurden für die Primer-Paare PCR-Abläufe mit verschiedenen Temperaturen (Temperaturgradienten) von +/-2.5 °C um die im Voraus in siliko berechnete Hybridisierungstemperatur der Primer im Dreifachansatz mit jeweils gleichen DNA Mengen aus Kulturmaterial durchgeführt. Der gewünschte Temperaturgradient ließ sich an den verwendeten PCR-Thermocyclern einstellen, so dass ein einziger PCR Zyklus mit verschiedenen Temperaturen gleichzeitig durchgeführt werden konnte. Im Anschluss an die PCR wurde eine Agarose Gel-Elektrophorese durchgeführt. Die Primeranlagerungs-Temperatur, aus welcher die am stärksten fluoreszierende DNA-Bande unter UV-Licht resultierte, wurde als optimale Temperatur festgelegt.

### 3.2.8.2 Technische Validierung von Assay B

#### 3.2.8.2.1 Analytische Spezifität

##### 3.2.8.2.1.1 Testung der analytischen Spezifität anhand klinischer Proben

Da *M. ulcerans* DNA-Extrakte aus Kulturmaterial ausschließlich DNA von *M. ulcerans* enthalten, kann anhand der Testung mit Kulturmaterial kein Rückschluss auf die Spezifität gegenüber menschlicher und bakterieller DNA gezogen werden welche in den Gesamt DNA Extrakten klinischer Proben enthalten ist. Deshalb wurde eine orientierende Prüfung der Spezifität anhand einer ausgewählten Anzahl (n =

4, jeweils zwei Wundabstriche und zwei Stanzbiopsien) IS2404-PCR negativer klinischer Gesamt DNA Extrakte durchgeführt, welche mit Gesamt DNA Extrakten aus *M. ulcerans* Kulturmaterial versetzt wurden (Mischverhältnis: 1 µl *M. ulcerans* DNA Extrakt aus Kulturmaterial zu 9 µl IS2404-PCR negativem klinischen Gesamt DNA Extrakt). Die Testung wurde anhand des entsprechenden PCR Protokolls für Assay B durchgeführt (siehe 3.2.6.1.2). Anschließend wurde eine Agarose Gel-Elektrophorese durchgeführt. Das Auftreten unspezifischer Amplifikate (als fluoreszierende Banden unter UV-Licht sichtbar) in dieser Testreihe wurde als Beweis der unspezifischen Amplifizierung menschlicher/bakterieller DNA gewertet und zählte als Ausschlusskriterium für die jeweiligen Primer-Paare.

#### 3.2.8.2.1.2 *Testung der analytischen Spezifität bezüglich DNA eng verwandter (myko-) bakterieller Spezies*

23 anhand phylogenetischer Gemeinsamkeiten und häufigem Vorkommen als Kommensale auf menschlicher Haut ausgewählte (Myko-) Bakterien wurden mit Assay B getestet, um die Spezifität der PCR Primer gezielt zu analysieren (siehe Tabelle 6, 3.1.6) [106] [111] [112]. Eine PCR mit Kulturextrakten der jeweiligen Bakterienstämme wurde mit dem PCR-Protokoll für Assay B durchgeführt (3.2.6.1.2).

### 3.2.9 Vergleich zwischen Assay A und B

#### 3.2.9.1 *Analytische Sensitivität (untere Nachweisgrenze)*

Als analytische Sensitivität der beiden Assays wurde die Anzahl an *M. ulcerans* Genomen (auch Genomäquivalente) definiert welche in einer 2 µl PCR Probe enthalten ist und noch zuverlässig nachgewiesen werden kann. Die analytische Sensitivität wurde als Intervall zwischen der letzten zu 100 % und der zu 90 % zuverlässig nachweisbaren Verdünnungsreihe aus *M. ulcerans* Kulturextrakten im Zehnfachansatz festgelegt (es mussten mindestens 90 % (9/10) der PCR Proben einer bestimmten Verdünnung in einem positiven Ergebnis resultieren). Zunächst wurden exakt quantifizierte Verdünnungsreihen von Kulturextrakten hergestellt (siehe 3.2.9.1.1). Die untere Nachweisgrenze wurde im Anschluss jeweils für Assay A und Assay B unter Idealbedingungen (Einsatz von Kulturextrakten anstatt klinischer Proben) bestimmt (siehe 3.2.9.1.2).

##### 3.2.9.1.1 Herstellung exakt quantifizierter Verdünnungsreihen aus *M. ulcerans* DNA-Extrakten aus Kulturmaterial

Zur Herstellung der Verdünnungsreihen wurde das *M. ulcerans* DNA-Extrakt aus Kulturmaterial (siehe 3.2.4.1) durch Hinzufügen von Aqua dest. in exponentiellen Schritten verdünnt. Die Ermittlung der exakten DNA-Konzentrationen (Genomäquivalente/2 µl) aufsteigender Verdünnungsreihen ab der Verdünnung  $10^{-3}$  erfolgte mittels IS2404-qPCR im Dreifachansatz. Die DNA-Konzentration der jeweiligen Verdünnungsreihen konnte anhand einer Standardkurve ermittelt werden. Die Standardkurve wurde im Rahmen der IS2404-qPCR durch den simultanen Einsatz von einer bereits in der AITM vorliegenden exakt quantifizierten Verdünnungsreihe aus IS2404-Plasmid-DNA (IS2404 Plasmid Standard) erstellt [61]. Ein Kulturextrakt wurde IS2404-qPCR-positiv gewertet, sobald es den festgesetzten IS2404-qPCR Schwellenwert (siehe Abbildung 8) überschritten hat. Zusammensetzung des Reaktionsendvolumens (20 µl) für eine IS2404-qPCR Reaktion:

H<sub>2</sub>O (11 µl), Primer IS2404 TF (Sequenz 5'-3': AAAGCACCACGCAGCATCT , 1 µl, 10 µM) und IS2404 TR (Sequenz 5'-3': AGCGACCCAGTGGATTG, 1 µl, 10 µM), Sonde IS2404 TP2 (Sequenz 5'-3': FAM-CCGTCCAACGCGATCGGCA-BBQ, 1 µl, 5 µM), qPCR Mix Plus (4 µl, 5 U/µl), 2 µl der gemäß 3.2.4.1 präparierten Nukleinsäuren bzw. 2 µl der Plasmid-DNA.

Die Amplifikation wurde im qPCR-Thermocycler (CFX 96 Real-Time System) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Die initiale Denaturierungsphase betrug 15 min bei 95 °C, dann folgten 45 Zyklen: Denaturierung (95 °C, 15 sec), Primeranlagerung und Extension (60 °C, 60 sec). Die Reaktion war nach terminaler Extension beendet, die Endtemperatur betrug 8 °C.

Die DNA-Konzentration der Verdünnungsreihe aus *M. ulcerans* DNA-Extrakten aus Kulturmaterial wurde nach abgelaufener IS2404-qPCR anhand der Standardkurve wie folgt ermittelt:

Die Standardkurve wurde in einem zweidimensionalen Koordinatensystem abgebildet, in welchem die x-Achse den logarithmischen Wert der Anzahl der IS2404 Kopien in den jeweiligen Verdünnungsreihen der Plasmid-DNA beginnend vom Ausgangswert ( $10^8$  Kopien der IS2404) (engl.: „log starting quantity“) skalierte. Die y-Achse skalierte die Anzahl an Amplifizierungszyklen (Cq, engl.: „quantification cycle“) bis zum Erreichen des Schwellenwertes (siehe Abbildung 9, 4.2.1.1). Die Cq-Werte der Verdünnungsreihe der *M. ulcerans* DNA-Extrakte aus Kulturmaterial im Dreifachansatz wurden der Standardkurve zugewiesen und der Wert der „log starting quantity“ (welche der logarithmierten Anzahl der IS2404 in den Plasmid-Standards entspricht) bestimmt. Da es sich bei dem gemittelten Wert der „log starting quantity“ um einen dekadischen Logarithmus handelt, wurde der Wert als Potenz der Zahl Zehn berechnet. Weiterhin musste berücksichtigt werden, dass die IS2404 bis zu 209 mal im Genom von *M. ulcerans* vertreten ist (201 Kopien im Chromosom, sowie vier Kopien pro pMUM Plasmid, welcher ein- bis zweimal pro *M. ulcerans* vorkommt) während nur ein einziges *rpoB*-Gen pro Genom existiert [62] [118]. Der ermittelte Wert, welcher der Anzahl der IS2404 entspricht muss daher durch 209 geteilt werden. Da dieser Wert der Anzahl von Genomen in 1 µl entspricht, muss er verdoppelt werden um auf die Konzentration von *M. ulcerans* Genomen pro 2 µl eingesetztem Template zu schließen. Es ergibt sich folgende Formel zur Errechnung der Genomäquivalente:

Anzahl Genomäquivalente/2 µl einer Verdünnungsreihe =  $10^{(\text{gemittelter Wert der log starting quantity})} * 2/209$

#### 3.2.9.1.2 Bestimmung der analytischen Sensitivität (untere Nachweisgrenze)

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität wurden die exakt quantifizierten exponentiellen Verdünnungsreihen aus Kulturmaterial (siehe 3.2.9.1.1) in aufsteigender Verdünnung im Zehnfachansatz mit der PCR von Assay A und B getestet, bis weniger als 90 % (9/10) der Proben in der anschließenden Agarose Gel-Elektrophorese spezifische Amplifikate zeigten (Überschreitung der Nachweisgrenze von 90 %). Die Konzentration der letzten exponentiellen Verdünnungsreihe, welche über der Nachweisgrenze lag, wurde anschließend im gleichen Verhältnis (1:1) mit Aqua dest. schrittweise verdünnt (lineare Verdünnungsreihe) und jeweils im Zehnfachansatz mit Assay A und B getestet, bis nur noch neun von zehn Proben PCR positiv waren. Der tatsächliche *M. ulcerans* DNA Gehalt dieser Probe der Verdünnungsreihe wurde anschließend mittels IS2404-qPCR ermittelt (siehe 3.2.9.1.1). Dieser DNA Gehalt wurde als das untere Intervall der analytischen Sensitivität des jeweiligen Assays definiert.

#### 3.2.9.2 Vergleich anhand klinischer Proben

##### 3.2.9.2.1 Erneute Testung klinischer Proben mit negativen/kontaminierten PCR-Ergebnissen in Assay A (aus der Pilotstudie) mit Assay B

Es wurde eine Liste mit zwölf klinischen Kulturextrakten aus Ghana erstellt, welche sich in der Pilotstudie mittels Assay A negativ zeigten oder kontaminierte Sequenzierungs-Ergebnisse ergeben

hatten. Um eine Vorauswahl zu treffen, wurde die *M. ulcerans* DNA Konzentration dieser Proben mittels IS2404-qPCR bestimmt. Die Proben welche eine DNA Konzentration oberhalb der in 4.2.1.2 ermittelten Nachweisgrenze der PCR von Assay B zeigten ( $n = 12$ , siehe 3.1.6 Tabelle 9) wurden mit Assay B erneut getestet.

#### 3.2.9.2.2 Vergleichende Testung klinischer Proben mit Assay A und Assay B

Sowohl Assay A als auch B wurden jeweils mit denselben 133 Gesamt DNA Extrakten aus Togo und Ghana (Wundabstriche,  $n = 63$ ; Feinnadelbiopsien [FNA],  $n = 40$ ; 3-mm Stanzbiopsien,  $n = 30$ ) getestet (siehe Tabelle 10, 3.1.6) [50] [52]. Alle Gesamt DNA Extrakte waren bereits mit der IS2404 PCR als *M. ulcerans* positiv getestet (siehe 3.2.4.2).

#### **Folgende Test-Parameter wurden für den Vergleich der Assays A und B herangezogenen:**

1. Die *rpoB*-PCR Positivitätsrate
2. Die PCR-Inhibitionsrate
3. Die *rpoB*-sequencing Positivitätsrate
4. Die Test-Effizienz

Die Definitionen der für den Vergleich der Assays A und B herangezogenen Test-Parameter sind unter 3.2.1.2 beschrieben.

#### **3.2.10 Statistische Auswertung**

Ergebnisse der jeweiligen Test-Parameter wurden sowohl für Assay A als auch B anhand des gesamten Probenkollektivs und nach Stratifizierung in die verschiedenen Probenarten (Wundabstriche, FNAs, Stanzbiopsien) statistisch ausgewertet. Als statistischer Test für verbundene Stichproben (Proben, welche sowohl mit Assay A als auch B getestet wurden) wurde der McNemar Test eingesetzt, welcher die Ergebnisse von Assay A und B in einer Vierfeldertafel anhand ihrer dichotomen Merkmale mittels der Nullhypothese analysiert. Bei Ausgangswerten von  $<5$  im zu analysierenden Ergebniskollektiv wurde anstelle des McNemar Test ein für kleine Stichprobengrößen konzipierter Signifikanztest angewendet (Exakter Test nach Fischer). P-Werte  $< 0.05$  wurden als signifikant gewertet. Die Konkordanzrate zeigt die Anzahl der Proben, welche bezüglich eines Test-Parameters das gleiche Ergebnis ergaben. Die Ergebnisse wurden in Prozentangaben tabellarisch aufgelistet, in Klammern wurden die absoluten Zahlen im Verhältnis zum Probenkollektiv des jeweiligen Test-Parameters hinterlegt (siehe Tabelle 15, 4.2.2.2). Konfidenzintervalle wurden mit 95 % angegeben, der tatsächliche Wert des jeweiligen Test-Parameters befindet sich demnach mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % innerhalb der errechneten Intervalle.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Assay B

#### 4.1.1 Etablierung von Assay B

##### 4.1.1.1 Design der PCR-Primer

Die Ausführungen in den folgenden Unterpunkten beziehen sich auf die letztendlich für die PCR des Assay B verwendeten MuB-F+R Primer (*Mycobacterium ulcerans* *rpoB* Forward- und Reverse-Primer). Eine Auflistung weiterer in der Studie getesteten Primer-Paare mit den jeweiligen Ausschlusskriterien befindet sich im Anhang (siehe Tabelle 18, 9.3).

##### 4.1.1.1.1 Bestimmung der Primer Spezifität anhand einer in siliko Analyse

Die *rpoB*-Gen Sequenzen der in Tabelle 11 (siehe 3.2.8.1.1.1) aufgelisteten Mykobakterien wurden mittels DNASIS Max graphisch dargestellt. Der polymorphe Bereich innerhalb des mykobakteriellen *rpoB*-Gens, welcher von Lee et al. 2003 beschrieben wurde, wurde analysiert. Die Darstellung ermöglichte die gezielte Suche nach *M. ulcerans* spezifischen Forward-Primern (siehe Abbildung 5). Der Vergleich der DNA-Sequenz von *M. ulcerans* mit den DNA-Sequenzen anderer Mykobakterien zeigte, dass selbst in der ausgewählten, polymorphen Genregion konservierte Genabschnitte anzutreffen sind, wodurch die Auswahl potenzieller Primer weiter eingeschränkt wurde. Die Abbildung zeigt ebenfalls die Bindungsstelle des MuB-F Primers, welcher in Assay B verwendet wurde (siehe 3.2.6.1.2). Die Analyse zeigte, dass die angewendete Definition von Spezifität als das Abweichen von mindestens 3 Basenpaaren innerhalb der Primer-Sequenz bezüglich des MuB-F Primer bei folgenden Spezies nicht erfüllt wurde: *M. marinum* (Abweichungen: 0 Bp), *M. avium* (Abweichungen: 1 Bp), *M. goodnae* (Abweichungen: 2 Bp), *M. szulgai* (Abweichungen: 2 Bp).

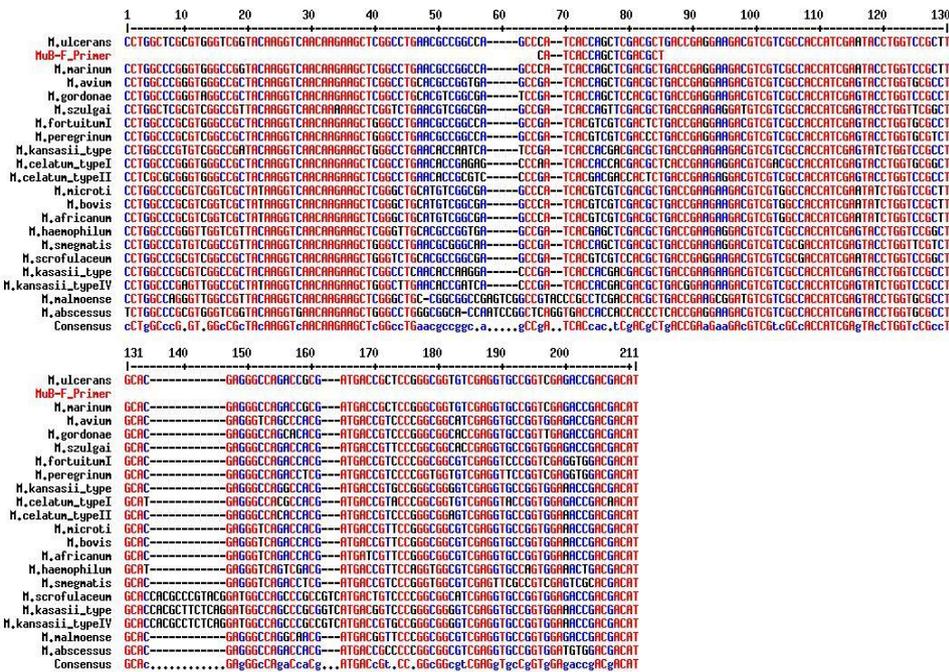


Abbildung 5: Vergleichende Darstellung der von Kim et. al. 2003 beschriebenen polymorphen Genregion innerhalb des *rpoB*-Gens  
 Vergleich der in Tabelle 11 (siehe 3.2.8.1.1.1) aufgelisteten Mykobakterien. Der in Assay B verwendete MuB-Forward-Primer ist ebenfalls dargestellt (rot markiert).

#### 4.1.1.1.2 Thermodynamische Eigenschaften der Primer

Die PCR-Primer wurden anhand der unter 3.2.8.1.1.2 beschriebenen thermodynamischen Kriterien ausgewählt.

Primer	Länge(Bp)	Schmelztemperatur(°C)	GC % <sup>a</sup>	any <sup>b</sup>	3' <sup>c</sup>	Pair any <sup>d</sup>	Pair 3' <sup>e</sup>
Mub-F	18	61,18	61,11	6	6	5	2
Mub-R	18	60,77	55,56	4	2		

**Tabelle 12: Thermodynamische Eigenschaften der in Assay B verwendeten Mub-F+R Primer.**

<sup>a</sup> Das Verhältnis der Basen Cytosin und Guanin zu Adenin und Thymin, <sup>b</sup> Self Complementarity 8, <sup>c</sup> 3' Self Complementarity, <sup>d</sup> Pair Complementarity, <sup>e</sup> 3' Pair Complementarity. Für Begriffsdefinitionen siehe 3.2.8.1.1.2.

Die Mub-F+R Primer zeigten insgesamt günstige thermodynamische Eigenschaften. Die „3' self complementarity“ des MuB-F Primer liegt jedoch mit 6 über dem Maximum von 3. In der weiteren Etablierung und Validierung des Assay B zeigten sich jedoch keine Hinweise auf eine negative Beeinflussung der PCR durch Selbst-Hybridisierung der Primer (siehe 3.2.8.1.1.2).

#### 4.1.1.2 Design des Sequenzier-Primers

Der Bseek-F Primer (*rpoB* seek Forward-Primer) für die Sequenzierung wurde anhand der unter 3.2.8.1.1.2 beschriebenen thermodynamischen Kriterien ausgewählt.

Primer	Länge(Bp)	Schmelztemperatur(°C)	GC % <sup>a</sup>	any <sup>b</sup>	3' <sup>c</sup>
Bseek-F	18	58,67	55,56	5	2

**Tabelle 13: Thermodynamische Eigenschaften des in Assay B verwendeten Bseek-F Primer.**

<sup>a</sup> Das Verhältnis der Basen Cytosin und Guanin zu Adenin und Thymin, <sup>b</sup> Self Complementarity 8, <sup>c</sup> 3' Self Complementarity.

#### 4.1.1.3 In vitro Testung der Primer anhand von Kulturmaterial und Optimierung des PCR-Protokolls

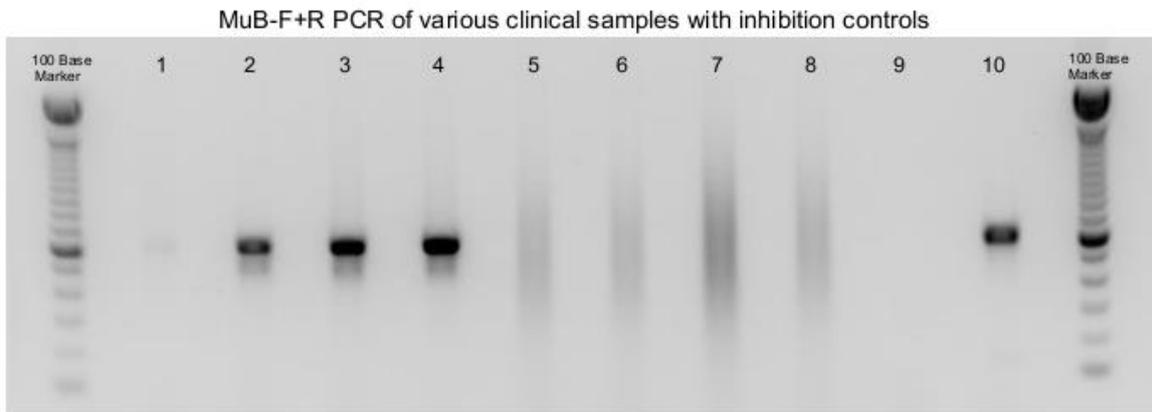
Der Test der Mub-F+R Primer anhand von *M. ulcerans* DNA Extrakten aus Kulturmaterial zeigte in der anschließenden Agarose Gel-Elektrophorese eine distinkte Bande bei 606 Bp und keinerlei unspezifische Banden aufgrund ungewollt amplifizierter DNA Fragmente. Die optimale Schmelztemperatur der MuB-F+R PCR zeigte sich bei 63 °C (zur möglichen Abweichung der realen Schmelztemperatur von der in siliko errechneten Schmelztemperatur siehe 3.2.8.1.4).

### 4.1.2 Technische Validierung von Assay B

#### 4.1.2.1 Analytische Spezifität

##### 4.1.2.1.1 Testung der analytischen Spezifität anhand klinischer Proben

Einige der getesteten Primer, welche im Test anhand von Kulturextrakten ausschließlich spezifische Amplifikate aufwiesen, zeigten im Test mit klinischen Proben (n = 4) unspezifische DNA-Amplifikate welche sich in der Agarose Gel-Elektrophorese als unspezifische Banden darstellten (siehe Tabelle 18 im Anhang, 9.3). Die letztendlich in Assay B verwendeten MuB-F+R Primer (siehe 3.2.6.1.2) zeigten ausschließlich spezifische Amplifikate in Form einer spezifischen Bande bei 606 Bp in der Agarose Gel Elektrophorese (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6: Agarose Gel-Elektrophorese im Anschluss an die MuB-F+R PCR**

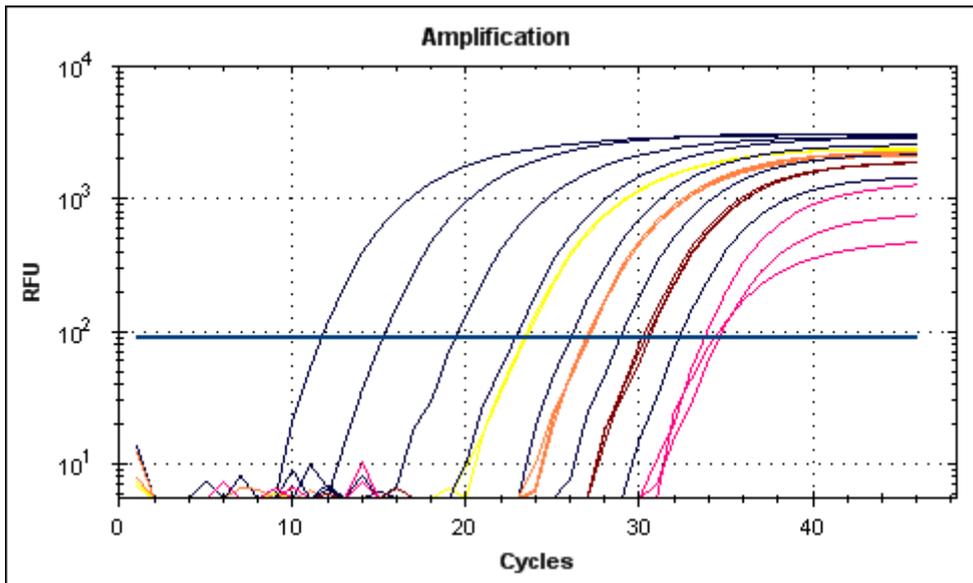
Die PCR wurde mit IS2404-PCR negativen Gesamt DNA Extrakten aus klinischen Proben aus Ghana durchgeführt welche mit Gesamt DNA Extrakten aus *M. ulcerans* Kulturmaterial versetzt wurden. 1: schwaches PCR Amplifikat auf Höhe 600 Bp; 2,3,4,10: deutliches PCR Amplifikat auf Höhe 600 Bp; 5,6,7,8: unspezifische DNA Anreicherungen; 9: kein PCR Amplifikat.

Interpretation: Es zeigt sich ein positives PCR Ergebnis (1 [schwach positiv], 3) und inhibierte Ergebnisse (5, 7); Inhibitionskontrollen (2, 4, 6, 8); Negativ-Kontrolle (9); Positiv-Kontrolle (10).

4.1.2.1.2 Testung der analytischen Spezifität bezüglich DNA eng verwandter (myko-) bakterieller Spezies

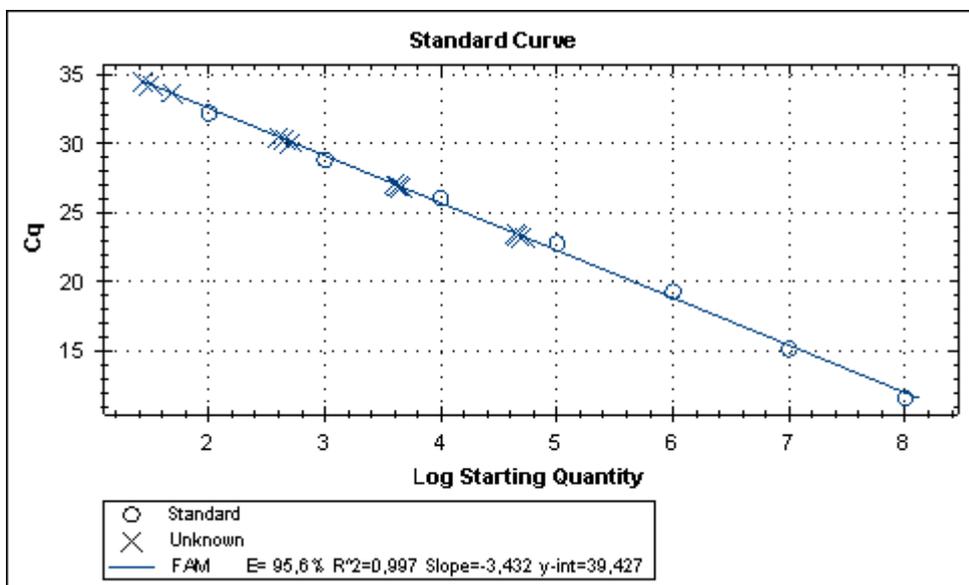
Nach durchgeführter MuB-F+R PCR zeigten ausschließlich die Proben der DNA Extrakte aus Kulturmaterial von *M. ulcerans* sowie *M. marinum* spezifische Banden in der Agarose Gel-Elektrophorese (siehe Tabelle 6, 3.1.6). Die DNA der weiteren 22 getesteten (myko-)bakteriellen Extrakte wurde nicht amplifiziert.





**Abbildung 8: Darstellung der Amplifikations-Zyklen der IS2404-qPCR zur Quantifizierung der Verdünnungsreihen**

Die Kurven stellen die Verdünnungsreihen aus den *M. ulcerans* DNA Kulturextrakten im Dreifachansatz ( $10^{-3}$  gelb,  $10^{-4}$  orange,  $10^{-5}$  braun,  $10^{-6}$  pink) sowie die IS2404 Plasmid Standards (blau) dar. Die auf der y-Achse dargestellte „RFU“ (engl.: „relative fluorescence units“) zeigt die durch vermehrte Amplifikation der DNA steigende Menge an freigesetzten fluoreszierenden DNA-Hybridisierungssonden auf logarithmierter Skala. Die horizontale blaue Linie repräsentiert den RFU-Schwellenwert welcher hier bei  $10^2$  Einheiten festgelegt ist. Bei Überschreiten des Schwellenwerts wird die jeweilige Probe als IS2404-qPCR positiv gewertet, die Anzahl an Amplifizierungsschritten (engl.: „cycles“, auf der x-Achse dargestellt) bis zum Erreichen des Schwellenwertes ist als Cq definiert. Anhand der Cq kann in Kombination mit der Standardkurve die DNA-Konzentration der Kulturextrakte bestimmt werden.



**Abbildung 9: Darstellung der in der IS2404-qPCR angewendeten Standardkurve**

Die Kreise entsprechen den IS2404 Plasmid Standards mit welchen die Standardkurve (blaue Linie) korreliert wurde. Die X-Markierungen zeigen die Verdünnungsreihen der Kulturextrakte (im Dreifachansatz), welche anhand ihrer Cq-Werte auf der Standardkurve positioniert wurden. Cq= Summe der IS2404-qPCR Amplifikationszyklen bis zum Erreichen des Schwellenwertes.

Probe	Cq <sup>a</sup>	Starting Quantity (SQ)	SQ Mean <sup>b</sup>	Genomäquivalente/ 2 µl
Standard1	11,6	100000000,0	100000000,0	956937,8
Standard 2	15,1	10000000,0	10000000,0	95693,8
Standard 3	19,3	1000000,0	1000000,0	9569,4
Standard 4	22,8	100000,0	100000,0	956,9
K5D 10 <sup>-3</sup>	23,5	44001,1	47024,3	450,0
K5D 10 <sup>-3</sup>	23,4	46474,4		
K5D 10 <sup>-3</sup>	23,3	50597,4		
Standard 5	26,0	10000,0	10000,0	95,7
K5D 10 <sup>-4</sup>	26,9	4520,8	4247,4	40,6
K5D 10 <sup>-4</sup>	27,0	4248,1		
K5D 10 <sup>-4</sup>	27,1	3973,1		
Standard 6	28,8	1000,0	1000,0	9,6
K5D 10 <sup>-5</sup>	30,3	453,0	457,1	4,4
K5D 10 <sup>-5</sup>	30,1	513,6		
K5D 10 <sup>-5</sup>	30,5	404,9		
Standard 7	32,2	100,0	100,0	1,0
K5D 10 <sup>-6</sup>	34,5	26,9	35,2	0,3
K5D 10 <sup>-6</sup>	34,3	31,4		
K5D 10 <sup>-6</sup>	33,7	47,2		

**Tabelle 14: Auflistung der errechneten Genomäquivalente/2 µl der Verdünnungsreihe der *M. ulcerans* DNA Kulturextrakte.**

(Kultur K5D, siehe 3.1.6); in absteigender Reihenfolge; Die Berechnung der DNA-Konzentration in Genomäquivalenten/2 µl für die eingesetzten Standards und die Verdünnungsreihe der Kulturextrakte 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> (in rot hervorgehoben) erfolgte anhand der folgenden Formel: Anzahl Genomäquivalente/2 µl einer Verdünnungsreihe = 10<sup>(gemittelter Wert der log starting quantity)</sup> \* 2/209 (siehe 3.2.9.1.1). <sup>a</sup> Summe der IS2404-qPCR Amplifikationszyklen bis zum Erreichen des Schwellenwertes, <sup>b</sup> gemittelter Wert der „starting quantity“, welche die Menge an IS2404-Insertionssequenzen in den Verdünnungsreihen angibt.

#### 4.2.1.2 Bestimmung der analytischen Sensitivität (untere Nachweisgrenze)

Assay A: Die untere Nachweisgrenze wurde für Assay A in der exponentiellen Verdünnungsreihe der *M. ulcerans* DNA Kulturextrakte bei der Verdünnung 10<sup>-4</sup> überschritten. In der daraufhin im Zehnfachansatz durchgeführten linearen Verdünnungsreihe bestätigte sich die Nachweisgrenze bei der Verdünnung 10<sup>-3</sup>:0. Die DNA Konzentration dieser Verdünnung wurde mit der IS2404-qPCR ermittelt und lag bei 450 Genomäquivalenten/µl. Demnach ergab sich eine analytische Sensitivität von 450-900 Genomäquivalenten für Assay A. (In der vorausgegangenen Publikation dieser Arbeit wurde auf der Basis des vorliegenden Ergebnis mit 1000-2000 Genomäquivalenten/µl eine konservativere Angabe getroffen [119]).

Assay B: Die untere Nachweisgrenze wurde für Assay B in der exponentiellen Verdünnungsreihe der *M. ulcerans* DNA Kulturextrakte bei der Verdünnung 10<sup>-5</sup> überschritten. In der daraufhin im Zehnfachansatz durchgeführten linearen Verdünnungsreihe wurde die Nachweisgrenze bei der Verdünnung 10<sup>-4</sup>:0 erreicht. Die exakte DNA Konzentration dieser Verdünnung wurde mit der IS2404-qPCR überprüft und lag bei 40 Genomäquivalenten/µl. Demnach ergab sich eine analytische Sensitivität von 40-80 Genomäquivalenten für Assay B. (In der vorausgegangenen Publikation dieser Arbeit wurde auf der Basis des vorliegenden Ergebnis mit 100-200 Genomäquivalenten/µl eine konservativere Angabe getroffen [119]).

## 4.2.2 Vergleich anhand klinischer Proben

### 4.2.2.1 Erneute Testung klinischer Proben mit negativen/kontaminierten PCR Ergebnissen in Assay A aus der Pilotstudie mit Assay B

Von den zwölf klinischen Proben, welche in der Pilotstudie unter Assay A PCR negative oder kontaminierte Ergebnisse zeigten und welche erneut mit Assay B getestet wurden, ergaben elf Proben ein positives Sequenzierungsergebnis. Dies entspricht einem Anteil von 91,7 %. Eine Probe verblieb in der PCR negativ.

### 4.2.2.2 Vergleichende Testung klinischer Proben durch Assay A und Assay B

Die Ergebnisse der vergleichenden Testung klinischer Proben durch Assay A und B finden sich in Tabelle 15 (siehe nächste Seite) zusammengefasst.

Im Vergleich zu Assay A mussten wesentlich mehr Proben, welche mit Assay B getestet wurden, aufgrund initialer PCR-Inhibition verdünnt werden (Assay A: 7,5 % [10/133], Assay B: 54,1 % [72/133]) ( $p < 0,01$ ). Die *rpoB*-PCR Positivitätsrate zeigte insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen Assay A (56,4 % [75/133]) und B (51,1 % [68/133]) ( $p=0,39$ ). Jedoch war diese für Wundabstriche in Assay A (50,8 % [32/63]) signifikant höher als in Assay B (30,2 % [19/63]) ( $p=0,02$ ). Unter allen Proben mit einem positiven *rpoB*-PCR Ergebnis in beiden Assays war der Anteil der Proben mit positivem Sequenzierungsergebnis in Assay B signifikant höher (98,0 % [48/49]) als in Assay A (85,7 % [42/49]) ( $p=0,03$ ). Der Anteil an positiven „*rpoB*-sequencing“ Ergebnissen von allen getesteten Proben (Test-Effizienz) betrug 39,8 % (53/133) für Assay A und 48,9 % (65/133) für Assay B ( $p=0,14$ ). Nach Stratifizierung der Ergebnisse der Test-Effizienz in die verschiedenen Probenarten zeigte sich dass die Test-Effizienz der FNAs in Assay B (70,0 % [28/40]) im Vergleich zu Assay A (35,0 % [14/40]) signifikant höher war ( $p < 0,01$ ). Die Genus-spezifischen Primer, welche in Assay A eingesetzt wurden, zeigten in 30,7 % aller Sequenzierungen eine Amplifikation von DNA anderer bakterieller Spezies. Einige dieser DNA Sequenzen konnten mittels auf GenBank hinterlegten DNA Sequenzen den folgenden bakteriellen Spezies zugeordnet werden: *Corynebacterium diphtheriae* (GenBank Nummer: CP003216), *Corynebacterium striatum* (GenBank Nummer: AY492267), *Burkholderia calcedonia* (GenBank Nummer: CIP 107098), *Serratia proteomaculans* (GenBank Nummer: NC\_009832), *Lactobacillus fermentum* (GenBank Nummer: CP002033). Assay B amplifizierte außer *M. ulcerans* Agy99 keine Sequenzen anderer Bakterien.

Test Parameter Probenart	Assay A	Assay B	Assay A und B	
	Anteil [in %] 95% Konfidenzintervall		Konkordanzrate <sup>a</sup>	Mc Nemar p <sup>b</sup>
<b>rpoB-PCR</b>				
Positivitätsrate				
Insgesamt <sup>c</sup>	56,4 (75/133)	51,1 (68/133)	66,2 (88/133)	0,39
	48,0 – 64,8	42,6 – 59,6	58,1 – 74,2	
Wundabstriche	50,8 (32/63)	30,2 (19/63)	57,1 (36/63)	0,02*
	38,4 – 63,1	18,8 – 41,5	44,9 – 69,4	
Stanzbiopsien	73,3 (22/30)	66,7 (20/30)	86,7 (26/30)	0,58
	57,5 – 89,2	49,8 – 83,5	74,5 – 98,8	
FNA	52,5 (21/40)	72,5 (29/40)	65,0 (26/40)	0,06
	37,0 – 68,0	58,7 – 86,3	50,2 – 79,8	
PCR-Inhibitionsrate <sup>d</sup>				
Insgesamt	7,5 (10/133)	54,1 (72/133)	48,9 (65/133)	<0,01*
	3,0 – 12,0	45,7 – 62,6	40,4 – 57,4	
Wundabstriche	9,5 (6/63)	65,1 (41/63)	41,3 (26/63)	<0,01*
	2,3 – 16,8	53,3 – 76,9	29,1 – 53,4	
Stanzbiopsien	6,7 (2/30)	30,0 (9/30)	76,7 (23/30)	0,02*
	0,0 – 15,6	13,6 – 46,4	61,5 – 91,8	
FNA	5,0 (2/40)	55,0 (22/40)	40,0 (16/40)	<0,01*
	0,0 – 11,8	39,6 – 70,4	24,8 – 55,2	
<b>rpoB-sequencing</b>				
Positivitätsrate				
Insgesamt <sup>e</sup>	85,7 (42/49)	98,0 (48/49)	87,8 (43/49)	0,03 <sup>*f</sup>
	75,9 – 95,5	94,0 – 100	78,6 – 96,9	
Wundabstriche	75,0 (9/12)	100 (12/12)	75,0 (9/12)	0,07 <sup>f</sup>
	50,5 – 99,5	N.A.	50,5 – 99,5	
Stanzbiopsien	100 (19/19)	100 (19/19)	100 (19/19)	N.A.
	N.A.	N.A.	N.A.	
FNA	77,8 (14/18)	94,4 (17/18)	77,8 (14/18)	0,15 <sup>f</sup>
	58,6 – 97,0	83,9 – 100	58,6 – 97,0	
Test-Effizienz <sup>g</sup>				
Insgesamt	39,8 (53/133)	48,9 (65/133)	74,4 (99/133)	0,14
	31,5 – 48,2	40,4 – 57,4	67,0 – 81,8	
Wundabstriche	28,6 (18/63)	27,0 (17/63)	73,0 (46/63)	0,84
	17,4 – 39,7	16,0 – 37,9	62,1 – 84,0	
Stanzbiopsien	70,0 (21/30)	66,7 (20/30)	90,0 (27/30)	0,78
	53,6 – 86,4	49,8 – 83,5	79,3 – 100	
FNA	35,0 (14/40)	70,0 (28/40)	65,0 (26/40)	<0,01*
	20,2 – 49,8	55,8 – 84,2	50,2 – 79,8	

**Tabelle 15: PCR- und Sequenzierungs-Ergebnisse aller in den Vergleich zwischen Assay A und B eingebrachten klinischen Proben.**

NA=nicht anwendbar, \*P-Werte < 0.05 wurden als signifikant gewertet. a Anteil der Proben mit konkordanten Ergebnissen in Assay A und Assay B aus allen Proben welche mit Assay A und B getestet wurden. b P-Wert des McNemar Tests. c Der Anteil an positiven rpoB-PCR Ergebnissen. d Anteil der Proben, welche in der unverdünnten PCR inhibierten. e Anteil der Proben, welche ein positives Sequenzierergebnis ergaben aus allen Proben mit einem positiven rpoB-PCR Ergebnis (jeweils Assay A oder B). f Exakter Test nach Fischer. g Der Anteil an Proben, welche ein positives Sequenzierergebnis aus allen getesteten Proben ergaben.

## 5 Diskussion

Resistenzen von *M. tuberculosis* gegenüber RMP stellen ein häufig beschriebenes Problem dar [90]. In einer ersten länderumfassenden Studie wurden in 3,8 % der Fälle RMP Resistenzen bei *M. leprae* festgestellt [91]. Die Möglichkeit der Resistenzentwicklung von *M. ulcerans* gegenüber RMP wurde anhand eines Laborversuchs an Mäusen unter RMP Monotherapie gezeigt [101]. Retrospektiv konnte durch Beissner et al. 2010 eine genotypische RMP Resistenz einer klinischen Probe zugeordnet werden [103]. Bei BUD Patienten unter Chemotherapie ist die Möglichkeit der Resistenzentwicklung somit theoretisch gegeben. Unregelmäßig und inadäquat eingesetzte Antibiotika zum Beispiel zur Prophylaxe von Sekundärinfektionen nach chirurgischer Behandlung von Ulzera stellen einen möglichen Risikofaktor zur Resistenzentwicklung beim Menschen dar [120]. Bisher existieren keine Studien zur Erfassung genotypischer RMP Resistenzen der BUD. Bisherige Erkenntnisse über RMP Resistenzen bei *M. ulcerans* aus klinischen Proben existieren lediglich aus der Pilotstudie von Beissner et al., deren Patientenkollektiv aus den Jahren 2004-2007 stammte, sowie der vorliegenden Arbeit. In der Arbeit von Beissner et al. zeigte sich eine geringe Prävalenz (0,9 %), die vorliegende Arbeit erbrachte keinen Nachweis von RMP Resistenzen [103] [121]. Jedoch erfolgte die Probenabnahme der klinischen Proben, welche in dieser Arbeit analysiert wurden, vor Beginn der antibiotischen Chemotherapie, sodass das Vorliegen medikamenteninduzierter RMP Resistenzen nicht zu erwarten war. Insgesamt wurde in beiden Arbeiten nur ein Bruchteil der klinischen Fälle in zwei endemischen Ländern analysiert, so dass keine Rückschlüsse auf die gesamte Resistenzlage möglich sind. In Anbetracht der erst 2004 eingeführten antibiotischen Chemotherapie kann eine abschließende Aussage zu der Entwicklung der Resistenzlage noch nicht getroffen werden. Da es derzeit keinen Anhalt für eine Mensch zu Mensch Übertragung von BUD gibt [12], ist eine rasche Ausbreitung möglicher RMP resistenter *M. ulcerans* Stämme wie im Fall von Lepra und Tuberkulose nach heutigem Wissensstand nicht als wahrscheinlich anzusehen. Jedoch kann in Anbetracht des unbekanntes Übertragungsweges und des/der letztlich unbekanntes Keimreservoir(s) keine wissenschaftlich fundierte Aussage zu möglichen Transmissionswegen und Persistenzmechanismen RMP resistenter *M. ulcerans* Stämme (wie z.B. die Rückführung RMP resistenter Stämme vom Mensch in die Umwelt oder die Vermehrung RMP resistenter Stämme in einem noch unbekanntes Keimreservoir) getroffen werden. Bislang standen keine Testverfahren zur schnellen und effektiven RMP Resistenzerkennung zu Verfügung. Die Kultivierung zur konventionellen Resistenztestung von Mykobakterien ist langwierig und kann für klinische Entscheidungen keine rechtzeitigen Ergebnisse erbringen.

Für das klinische Management der BUD Patienten mit zeitlichen Unterschieden im klinischen Verlauf, insbesondere bei den „slow healers“ (siehe 1.9.4), stellt die Unkenntnis über mögliche RMP Resistenzen ein besonderes Problem dar. Während einige Ulzera bereits nach wenigen Wochen keine viablen *M. ulcerans* mehr aufweisen und stetig abheilen, zeigen sich ebenso prolongierte Verläufe, welche auch nach abgeschlossener Chemotherapie noch viable *M. ulcerans* aufweisen und erst Monate danach abheilen [68]. Da das Vorliegen aktiver Ulzera mit viablen Mykobakterien nach erfolgter Chemotherapie durch die Präsenz einer RMP Resistenz begründet sein kann, könnte nach erfolgreichem Nachweis viabler Mykobakterien durch den 16S rRNA-Viabilitäts-Assay nach achtwöchiger Chemotherapie im zweiten Schritt die Resistenztestung mittels Assay B erfolgen. Somit könnten durch Kombination des 16S rRNA-Viabilitäts-Assays mit Assay B begründete Verdachtsfälle selektiv der Resistenz-Testung zugeführt werden.

Die frühzeitige Anwendung eines effektiven molekularen Assays, welcher Mutationen der RRDR bei *M. ulcerans* Stämmen mit phänotypischer RMP Resistenz detektiert, könnte somit einen wichtigen Beitrag zum klinischen Management bei Verdacht auf RMP Resistenzen leisten. Durch RMP Resistenzen nicht

heilende Ulzera könnten durch zeitgerechte Umstellung der Therapie (z.B. operative Versorgung) erfolgreich behandelt werden. Komplikationen der BUD wie verzögerte Wundheilung, körperliche Einschränkungen durch Kontrakturen, Deformationen oder Amputationen könnten so vermieden werden. Auch die zukünftige Erfassung der Resistenzlage in endemischen Gebieten der BUD sowie Erkenntnisse zum genotypischen RMP Resistenzverhalten von *M. ulcerans* werden durch einen raschen und effektiven Assay begünstigt.

Während sich im Vergleich der Assays A und B bezüglich der gesamten Test-Effizienz kein Unterschied unterhalb des Signifikanzniveaus zeigte ( $p=0.14$ ) erbrachte die Stratifizierung der Ergebnisse in die Probenarten und Teilschritte der beiden Assays teilweise signifikante Unterschiede.

Die *rpoB*-PCR Positivitätsrate der Wundabstriche fiel bei Assay A um 20 % signifikant höher aus als bei Assay B ( $p=0,02$ ). Jedoch ergaben diejenigen Wundabstriche, welche in beiden Assays *rpoB*-PCR positive Ergebnisse zeigten, im anschließenden Sequenzierungsschritt zu 100 % analysierbare Sequenzen in Assay B und nur zu 75 % in Assay A. Somit zeigte sich aufgrund der hohen *rpoB*-sequencing Positivitätsrate in der Test-Effizienz für die Wundabstriche kein signifikanter Unterschied ( $p=0.84$ ). Insgesamt zeigte sich die *rpoB*-sequencing Positivitätsrate in Assay B signifikant höher als in Assay A ( $p=0,03$ ). Der vergleichsweise hohe Anteil unspezifischer Sequenzen in Assay A (30,7%) konnte teilweise der DNA anderer Bakterienspezies zugeordnet werden, während sich in Assay B ausschließlich *M. ulcerans* DNA zeigte. Die Testung der analytischen Spezifität anhand eng verwandter (myko-) bakterieller Spezies, in welcher sich ausschließlich *M. ulcerans* und *M. marinum* positiv zeigten, bestätigten zusätzlich eine hohe analytische Spezifität des Assays B (siehe 4.1.2.1.2). Die *rpoB*-Gene der mykobakteriellen Spezies, welche trotz nur geringer Abweichungen von der Bindungsstelle des PCR Forward-Primers nicht amplifiziert wurden (*M. avium*, *M. goodnae*, *M. szulgai*, siehe 4.1.1.1.1) weisen vermutlich signifikante Abweichungen in der Bindungsregion des PCR Reverse-Primers auf. Der in Assay B sequenzierte DNA Abschnitt von *M. ulcerans* und *M. marinum* unterscheidet sich in 2 Basenpaaren. Dadurch können die beiden Spezies differenziert werden, sodass *M. ulcerans* durch Assay B zu 100 % korrekt identifiziert werden kann.

Während die Stratifizierung des Ergebnisses der Test-Effizienz in die verschiedenen Arten der Proben für Wundabstriche und Stanzbiopsien keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Assays zeigte, resultierten für FNAs bei Assay B 70 % und bei Assay A 35 % positive Sequenzen ( $p=0,01$ ). Dies entspricht einer Differenz von 35 % in dieser Studie und einer Steigerung um 34,7 % zwischen FNAs in dieser Studie verglichen mit der Test-Effizienz aller Probenarten in der Pilotstudie (eine Stratifizierung des Probenkollektiv in FNAs ist bei der Pilotstudie nicht möglich, da FNAs noch nicht als Probenart etabliert waren. Aufgrund dieses Ergebnisses scheinen FNAs zur Überprüfung auf RMP Resistenzen die am besten geeignete Abnahmemethode bei nicht-ulzerierten Läsionen zu sein. FNAs werden von der WHO als Art der Probeabnahme für nicht-ulzerierte Manifestationen und Ulzera mit vernarbten Wundrändern empfohlen [51].

Die PCR-Inhibitionsrate von Assay B war sowohl insgesamt als auch nach Stratifizierung in die verschiedenen Probenarten signifikant höher. So mussten 54 % der Proben von Assay B im Vergleich zu nur 8 % der Proben von Assay A mindestens im Verhältnis 1 : 10 verdünnt werden wodurch die DNA Konzentration in den betroffenen Proben abnahm und die *rpoB*-PCR Positivitätsrate mit hoher Wahrscheinlichkeit negativ beeinflusst wurde. Das Hautpigment Melanin, welches in den Gewebeproben aus Afrika reichlich vorhanden ist, bindet die DNA-Polymerase und ist als potenter PCR Inhibitor bekannt (Eckhart et al. 2000). Aufgrund der hohen PCR-Inhibitionsrate in Assay B vermuten wir eine höhere Melanin-Empfindlichkeit der KOD Hot Start DNA Polymerase des Assay B gegenüber der AmpliTaq Gold DNA Polymerase des Assay A. Dieses Ergebnis hat die potentiell überlegene analytische Sensitivität des Assays B bei klinischen Proben verringert und kann als Schwachstelle der

Studie gewertet werden. Möglichkeiten zur Bindung des Melanins in Proben z.B. durch Zugabe von bovinem Albumin wurden beschrieben [122] [123]. Im Hinblick auf Folgestudien zur weiteren Steigerung der *rpoB*-PCR Positivitätsrate des Assay B könnte eine Versuchsreihe das Potential dieser Methode untersuchen. Ein weiterer Ansatz zur Reduzierung der Präsenz von PCR Inhibitoren und zur Sicherstellung eines möglichst hohen *M. ulcerans* DNA Gehaltes in den Gesamt DNA Extrakten aus klinischen Proben in zukünftigen Studien stellt die Optimierung der DNA Extraktion und die Aufbereitung der DNA Extrakte dar, zum Beispiel durch Phenol-Chloroform-Extraktion zur Trennung der DNA von ungewollten Proteinen. Der Fokus dieser Studie war die Optimierung des PCR- und Sequenzierungsschrittes der molekularen Resistenzbestimmung, daher wurde die DNA-Extraktion nicht weiter untersucht.

Die Resistenzbestimmung von Patientenproben im klinischen Alltag mittels Sequenzierung erfordert die Präsenz von teuren Sequenzierungs-Geräten und deren Zugänglichkeit. Dies ist in vielen endemischen Ländern der BUD jedoch nicht gegeben, so dass bis dato die Resistenztestung nahezu ausschließlich im Rahmen internationaler Kooperationen bzw. Forschungsprojekten stattfinden kann. Durch die oben genannte Kombination mit dem 16S rRNA-Viabilitäts-Assay kann durch Vorselektion der klinischen Verdachtsfälle die Abhängigkeit von Sequenzierungen zur Resistenzbestimmung minimiert werden [61]. Gänzlich ohne Sequenzierungsschritt arbeiten alternative Testverfahren wie High Resolution Melt Assays. Diese detektieren die unterschiedlichen Hybridisierungstemperaturen kurzer DNA Abschnitte welche sich bei Vorliegen von SNPs (engl.: „single nucleotide polymorphism“, Polymorphismen einzelner Nukleotide wie z.B. Punktmutationen) bei ansonsten identischen DNA Sequenzen feststellen lassen. High Resolution Melt Assays stellen effektive und potentiell kostengünstigere Methoden zur Detektion von SNPs dar und werden bereits zur Detektion von Antibiotika-Resistenzen von Mykobakterien eingesetzt [124] [125]. Potentiell können diese Methoden auch als Testverfahren bei *M. ulcerans* eingesetzt werden. Jedoch lassen sich zunächst nur mittels Sequenzierung Erkenntnisse über die häufigsten Lokationen von Punktmutationen innerhalb der RRDR gewinnen. Bei der Resistenzforschung zu *M. tuberculosis* und *M. leprae* hat sich gezeigt, dass einige der resistenzauslösenden Punktmutationen den entsprechenden Kodons der anderen Spezies zugeordnet werden können, wohingegen andere Mutationen spezifisch für die jeweilige Spezies sind [100] [126] [97]. Durch Sequenzierung der RRDR mittels des in dieser Arbeit entwickelten Assays B lassen sich Erkenntnisse bezüglich häufiger Punktmutationen und deren Relevanz bezüglich möglicher RMP Resistenzen erzielen. Diese Erkenntnisse können dann für die Etablierung der beschriebenen, effektiven und kostengünstigeren High Resolution Melt Assays genutzt werden um perspektivisch die gezielte Diagnose von SNPs innerhalb der RRDR zu ermöglichen. Die in Assay B entwickelten, *M. ulcerans* spezifischen Primer können bei diesen Methoden eventuell weiterhin eingesetzt werden.

In Anbetracht der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit kann das Ergebnis als insgesamt positiv bewertet werden. Wesentliche Teilaspekte des bestehenden molekularen Assay zur RMP Resistenzbestimmung von *M. ulcerans* konnten erfolgreich optimiert werden, so dass nun ein Assay zur Verfügung steht, welcher spezifischer (analytische Spezifität) und in Abhängigkeit der verwendeten Probenart sensitiver (analytische Sensitivität) ist. Neben der Resistenzdetektion in klinischen BUD Fällen sollte Assay B zur weiteren Forschung im Bereich der molekularen Resistenzentwicklung von *M. ulcerans* eingesetzt werden, um eine Weiterentwicklung des Assays (z.B. zum High Resolution Melt Assay) und Nutzbarmachung in endemischen Ländern zu ermöglichen. Da die zukünftige Resistenzentwicklung angesichts der erst seit kurzem eingeführten Chemotherapie noch nicht absehbar ist, sollte der neue Assay zudem im Rahmen von weiteren Studien zur Erforschung der Resistenzlage eingesetzt werden. Der übergeordnete Nutzen dieser Arbeit liegt in dem Konzept der frühzeitigen Resistenzerkennung. Es wird dabei versucht an den Lehren historischer Ereignisse im Bereich der mykobakteriellen

Resistenzentwicklung und Ausbreitung anzuknüpfen und Lösungsansätze zu finden, um die große Errungenschaft der effektiven antimykobakteriellen Chemotherapie in Zukunft schützen zu können.

## 6 Zusammenfassung

Das *Mycobacterium ulcerans* ist der Erreger der Buruli Ulkus Erkrankung (BUD), einer chronisch nekrotisierenden Infektionskrankheit der Haut und des subkutanen Fettgewebes. Die BUD ist die dritthäufigste mykobakterielle Erkrankung und zählt zu den vernachlässigten Tropenkrankheiten. Fälle der BUD wurden bislang aus 35 meist (sub-) tropischen Ländern berichtet. Der genaue Transmissionsmechanismus von *M. ulcerans* ist bislang nicht abschließend geklärt. Die BUD wird sehr wahrscheinlich aus der Umwelt übertragen, es existieren keine Hinweise für eine direkte Mensch zu Mensch Übertragung. Die BUD weist eine geringe Letalität auf. Jedoch tritt auch nach Ausheilung ein hohes Maß an Komplikationen auf, insbesondere funktionelle Limitationen durch Kontrakturen, Deformationen und Amputationen. Im Jahr 2004 wurde von der WHO die Empfehlung für eine antimikrobielle achtwöchige Chemotherapie mit Rifampicin und Streptomycin ausgesprochen. Es zeigten sich unter dieser Therapie bislang hohe Remissionsraten bei niedrigen Rezidivraten. In Laborexperimenten konnte unter RMP Monotherapie am Mausmodell die Entstehung von RMP Resistenzen beobachtet werden. Der Resistenzmechanismus ist analog zum Mycobacterium-tuberculosis-Komplex und zu *M. leprae* und beruht auf Punktmutationen in der „rifampicin resistance determining region“ (RRDR) des *rpoB* Gens, welches die Beta-Untereinheit der (myko-)bakteriellen RNA-Polymerase kodiert. Die aktuelle Resistenzlage ist weitestgehend unerforscht, bislang konnte lediglich ein RMP resistenter *M. ulcerans* Stamm einem klinischen BUD Fall retrospektiv zugewiesen werden. In Anbetracht der erst 2004 eingeführten antibiotischen Chemotherapie kann eine abschließende Aussage zu der Entwicklung der Resistenzlage jedoch noch nicht getroffen werden, Studien zur Resistenzentwicklung existieren nicht. Zuverlässige und schnelle Testverfahren zur routinemäßigen Detektion von RMP resistenten *M. ulcerans* Stämmen waren bislang nicht verfügbar. Der Nachweis von RMP resistenten *M. ulcerans* Stämmen durch Kultivierung und konventionelle Resistenzbestimmung dauert meist mehrere Wochen. Die molekulare Resistenzbestimmung erfolgt durch PCR-Amplifikation und die anschließende Sequenzierung der RRDR aus der *M. ulcerans* DNA von klinischen Proben (Probenarten: Feinnadelbiopsien, Stanzbiopsien, Wundabstriche) und kann je nach Laborkapazität in ein bis zwei Tagen durchgeführt werden. Ein molekularer Test zur RMP Resistenzbestimmung von *M. ulcerans* (Assay A), welcher anhand klinischer Proben aus den Jahren 2004-2007 im Rahmen einer Pilotstudie von Beissner et al. eingesetzt wurde ergab eine geringe Test-Effizienz (35,3 %) im Vergleich zu Proben aus Kulturmaterial (91,7 %). Der Anteil nicht analysierbarer klinischer Proben (64,7 %) teilt sich in Proben mit negativem *rpoB*-PCR Ergebnis (63,4 %) und Proben welche in der anschließenden Sequenzierung der PCR Amplifikate unspezifische oder kontaminierte Sequenzen ergaben (36,6 %). Die übergeordnete Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Verbesserung der Test-Effizienz der molekularen RMP Resistenzbestimmung von klinischen *M. ulcerans* Gesamt DNA Extrakten. Dieses Ziel sollte durch Optimierung des Anteils an Proben mit einem positiven Ergebnis in der *rpoB*-PCR (*rpoB*-PCR Positivitätsrate) sowie der Anteil der *rpoB*-PCR positiven Proben welche in der anschließenden Sequenzierung ein positives Sequenzier-Ergebnis erzielen (*rpoB*-sequencing Positivitätsrate) erreicht werden. In dieser Studie wurde ein optimierter Assay (Assay B) etabliert und validiert welcher durch eine erhöhte analytische Spezifität als *M. ulcerans* spezifisch angesehen wird. Trotz einer ebenfalls höheren analytischen Sensitivität des Assay B anhand der Testung an DNA Extrakten aus Kulturmaterial zeigte Assay B anhand von Gesamt DNA Extrakten aus klinischen Proben eine signifikant höhere PCR-Inhibitionsrate. Da die Test-Effizienz der Feinnadelbiopsien in Assay B signifikant höher war als in Assay A scheint diese Probenart zur molekularen Resistenzbestimmung mittels Assay B am besten geeignet zu sein. Der Assay findet potentielle Anwendung in der Erforschung des genotypischen RMP Resistenzverhaltens von *M.*

*ulcerans*, in der schnellen RMP Resistenzdiagnostik zur Unterstützung klinischer Therapieentscheidungen sowie in der Durchführung zukünftiger Studien zur RMP Resistenzfassung. Der Assay kann zudem eine wichtige Rolle in der Entwicklung weiterer molekularer Assays zur Resistenzbestimmung wie z.B. High Resolution Melt Assays zur routinemäßigen Resistenzbestimmung einnehmen. Möglichkeiten zur Optimierung bestehen in der DNA Extraktion sowie Aufbereitung der klinischen Proben zur Vermeidung der PCR-Inhibition. In Anbetracht der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit kann das Ergebnis als insgesamt positiv bewertet werden. Der übergeordnete Nutzen dieser Arbeit liegt in dem Konzept der frühzeitigen Resistenzerkennung, welches versucht, an den Lehren historischer Ereignisse im Bereich der mykobakteriellen Resistenzentwicklung und Ausbreitung anzuknüpfen und Lösungsansätze zu finden.

## Literaturverzeichnis:

- [1] WHO, "Buruli ulcer Fact sheet," *WHO*, 2017. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs199/en/>. [Accessed: 10-Jan-2018].
- [2] F. Portaels, M. T. Silva, and W. M. Meyers, "Buruli ulcer," *Clin. Dermatol.*, vol. 27, no. 3, pp. 291–305, 2009.
- [3] V. Pommelet *et al.*, "Findings in patients from Benin with osteomyelitis and polymerase chain reaction-confirmed *Mycobacterium ulcerans* infection.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 59, no. 9, pp. 1256–64, Nov. 2014.
- [4] G. Bretzel and M. Beissner, "PCR detection of *Mycobacterium ulcerans* —significance for clinical practice and epidemiology," *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 18, no. 12, pp. 1063–1074, Dec. 2018.
- [5] WHO, "Neglected tropical diseases," *WHO*, 2017. [Online]. Available: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/). [Accessed: 11-Jan-2018].
- [6] WHO, "Global Health Observatory data repository. Buruli ulcer. Number of new cases reported: 2017," 2017. [Online]. Available: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.A1631>. [Accessed: 11-Nov-2018].
- [7] D. Zingue, A. Bouam, R. B. D. Tian, and M. Drancourt, "Buruli Ulcer, a Prototype for Ecosystem-Related Infection, Caused by *Mycobacterium ulcerans*," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 31, no. 1, pp. e00045-17, 2018.
- [8] G. Pluschke and K. Röltgen, "Epidemiology and disease burden of Buruli ulcer: a review," *Res. Rep. Trop. Med.*, vol. 6, p. 59, Nov. 2015.
- [9] J. Guarner, "Buruli Ulcer: Review of a Neglected Skin Mycobacterial Disease," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 56, no. 4, pp. e01507-17, Jan. 2017.
- [10] M. J. Loftus *et al.*, "Epidemiology of Buruli Ulcer Infections, Victoria, Australia, 2011–2016," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 24, no. 11, pp. 1988–1997, Nov. 2018.
- [11] R. R. Yotsu *et al.*, "Buruli Ulcer: a Review of the Current Knowledge," *Curr. Trop. Med. Reports*, vol. 5, no. 4, pp. 247–256, Dec. 2018.
- [12] R. W. Merritt *et al.*, "Ecology and Transmission of Buruli Ulcer Disease: A Systematic Review," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 4, no. 12, p. e911, 2010.
- [13] D. P. O'Brien *et al.*, "Exposure Risk for Infection and Lack of Human-to-Human Transmission of *Mycobacterium ulcerans* Disease, Australia," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 23, no. 5, pp. 837–840, May 2017.
- [14] D. S. Walsh, F. Portaels, and W. M. Meyers, "Recent advances in leprosy and Buruli ulcer (*Mycobacterium ulcerans* infection)," *Curr. Opin. Infect. Dis.*, vol. 23, no. 5, pp. 445–455, 2010.
- [15] L. Marsollier *et al.*, "Aquatic Insects as a Vector for *Mycobacterium ulcerans*," *Appl. Environmental Microbiol.*, vol. 68, no. 9, pp. 4623–8, 2002.
- [16] L. Marsollier *et al.*, "Aquatic snails, passive hosts of *Mycobacterium ulcerans*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 10, pp. 6296–6298, 2004.
- [17] F. Portaels *et al.*, "First cultivation and characterization of *Mycobacterium ulcerans* from the

- environment," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 2, no. 3, p. e178, 2008.
- [18] M. Eddyani *et al.*, "Potential Role for Fish in Transmission of *Mycobacterium ulcerans* Disease (Buruli Ulcer): an Environmental Study," *Society*, vol. 70, no. 9, pp. 5679–5681, 2004.
- [19] J. A. M. Fyfe *et al.*, "A major role for mammals in the ecology of *Mycobacterium ulcerans*," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 4, no. 8, p. e791, 2010.
- [20] P. D. Johnson *et al.*, "Mycobacterium ulcerans in Mosquitoes Captured during Outbreak of Buruli Ulcer, Southeastern Australia," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 13, no. 11, pp. 1653–1660, Nov. 2007.
- [21] C. J. Lavender *et al.*, "Risk of Buruli Ulcer and Detection of *Mycobacterium ulcerans* in Mosquitoes in Southeastern Australia," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 5, no. 9, p. e1305, Sep. 2011.
- [22] J. R. Wallace *et al.*, "Mycobacterium ulcerans low infectious dose and mechanical transmission support insect bites and puncturing injuries in the spread of Buruli ulcer," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 11, no. 4, p. e0005553, Apr. 2017.
- [23] S. Faria, I. Joao, and L. Jordao, "General Overview on Nontuberculous Mycobacteria, Biofilms, and Human Infection," *J. Pathog.*, vol. 2015, pp. 1–10, 2015.
- [24] C. A. Narh, L. Mosi, C. Quaye, S. Tay, B. Bonfoh, and D. K. Souza<sup>1</sup>, "Genotyping Tools for *Mycobacterium ulcerans* Drawbacks and Future Prospects," *Mycobact. Dis.*, vol. 4, no. 2, p. 1000149, 2014.
- [25] T. P. Stinear *et al.*, "Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer," *Genome Res.*, vol. 17, no. 2, pp. 192–200, 2007.
- [26] C. Demangel, T. P. Stinear, and S. T. Cole, "Buruli ulcer: reductive evolution enhances pathogenicity of *Mycobacterium ulcerans*," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, no. 1, pp. 50–60, Jan. 2009.
- [27] K. D. Doig *et al.*, "On the origin of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer," *BMC Genomics*, vol. 13, no. 1, p. 258, Jun. 2012.
- [28] S. J. Pidot, K. Asiedu, M. Käser, J. A. M. Fyfe, and T. P. Stinear, "Mycobacterium ulcerans and other mycolactone-producing mycobacteria should be considered a single species," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 4, no. 7, p. e663, Jul. 2010.
- [29] H. Hong, E. Coutanceau, M. Leclerc, L. Caleechurn, P. F. Leadlay, and C. Demangel, "Mycolactone diffuses from *Mycobacterium ulcerans*-infected tissues and targets mononuclear cells in peripheral blood and lymphoid organs," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 2, no. 10, pp. 1–8, 2008.
- [30] F. S. Sarfo, R. Phillips, M. Wansbrough-Jones, and R. E. Simmonds, "Recent advances: role of mycolactone in the pathogenesis and monitoring of *Mycobacterium ulcerans* infection/Buruli ulcer disease," *Cell. Microbiol.*, vol. 18, no. 1, pp. 17–29, Jan. 2016.
- [31] J. En *et al.*, "Mycolactone cytotoxicity in Schwann cells could explain nerve damage in Buruli ulcer," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 11, no. 8, p. e0005834, Aug. 2017.
- [32] E. Marion *et al.*, "Mycobacterial Toxin Induces Analgesia in Buruli Ulcer by Targeting the Angiotensin Pathways," *Cell*, vol. 157, no. 7, pp. 1565–1576, Jun. 2014.

- [33] J. A. Trubiano, C. J. Lavender, J. A. M. Fyfe, S. Bittmann, and P. D. R. Johnson, "The Incubation Period of Buruli Ulcer (Mycobacterium ulcerans Infection)," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 7, no. 10, p. e2463, Oct. 2013.
- [34] M. J. Loftus *et al.*, "The incubation period of Buruli ulcer (Mycobacterium ulcerans infection) in Victoria, Australia – Remains similar despite changing geographic distribution of disease," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 12, no. 3, p. e0006323, Mar. 2018.
- [35] WHO, "Treatment of Mycobacterium Ulcerans Disease (Buruli Ulcer)-Guidance For Health Workers," Geneva, Switzerland, 2012.
- [36] R. R. Yotsu *et al.*, "Revisiting Buruli ulcer," *J. Dermatol.*, vol. 42, no. 11, pp. 1033–1041, Nov. 2015.
- [37] M. T. Ruf *et al.*, "Secondary buruli ulcer skin lesions emerging several months after completion of chemotherapy: Paradoxical reaction or evidence for immune protection?," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 5, no. 8, pp. 1–9, 2011.
- [38] D. P. O'Brien, M. E. Robson, P. P. Callan, and A. H. McDonald, "Paradoxical immune-mediated reactions to Mycobacterium ulcerans during antibiotic treatment: a result of treatment success, not failure," *Med. J. Aust.*, vol. 191, no. 10, pp. 564–6, Nov. 2009.
- [39] W. A. Nienhuis *et al.*, "Paradoxical responses after start of antimicrobial treatment in Mycobacterium ulcerans infection.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 54, no. 4, pp. 519–26, Feb. 2012.
- [40] C. L. Gordon *et al.*, "Spontaneous clearance of Mycobacterium ulcerans in a case of Buruli ulcer.," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 5, no. 10, p. e1290, Oct. 2011.
- [41] M. Beissner *et al.*, "Spontaneous clearance of a secondary Buruli ulcer lesion emerging ten months after completion of chemotherapy—a case report from Togo.," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 6, no. 7, p. e1747, Jul. 2012.
- [42] WHO, "Buruli ulcer-Prevention of disability (POD)," Geneva, Switzerland, 2006.
- [43] Y. Stienstra *et al.*, "Factors associated with functional limitations and subsequent employment or schooling in Buruli ulcer patients.," *Trop. Med. Int. Health*, vol. 10, no. 12, pp. 1251–7, 2005.
- [44] M. Schunk *et al.*, "Outcome of patients with buruli ulcer after surgical treatment with or without antimycobacterial treatment in Ghana," *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 81, no. 1, pp. 75–81, 2009.
- [45] D. E. Ellen, Y. Stienstra, M. a Teelken, P. U. Dijkstra, W. T. a van der Graaf, and T. S. van der Werf, "Assessment of functional limitations caused by Mycobacterium ulcerans infection: towards a Buruli ulcer functional limitation score.," *Trop. Med. Int. Health*, vol. 8, no. 1, pp. 90–6, 2003.
- [46] Y. Barogui *et al.*, "Functional limitations after surgical or antibiotic treatment for Buruli ulcer in Benin," *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 81, no. 1, pp. 82–87, 2009.
- [47] M. Beissner *et al.*, "Treatment Outcome of Patients with Buruli Ulcer Disease in Togo," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 9, no. 10, pp. 1–12, 2015.
- [48] K. Peeters Grietens, A. Um Boock, H. Peeters, S. Hausmann-Muela, E. Toomer, and J. Muela Ribera, "'It Is Me Who Endures but My Family That Suffers': Social Isolation as a Consequence of the Household Cost Burden of Buruli Ulcer Free of Charge Hospital Treatment," *PLoS Negl.*

- Trop. Dis.*, vol. 2, no. 10, p. e321, Oct. 2008.
- [49] H. B. Amoakoh and M. Aikins, "Household cost of out-patient treatment of Buruli ulcer in Ghana: a case study of Obom in Ga South Municipality.," *BMC Health Serv. Res.*, vol. 13, p. 507, Dec. 2013.
- [50] M. Beissner *et al.*, "Implementation of a National Reference Laboratory for Buruli Ulcer Disease in Togo," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 7, no. 1, p. e2011, 2013.
- [51] WHO, "Guidance on sampling techniques for laboratory-confirmation of *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer disease)," Geneva, Switzerland, 2010.
- [52] G. Bretzel *et al.*, "Laboratory confirmation of buruli ulcer disease in togo, 2007-2010," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 5, no. 7, pp. 2007–2010, 2011.
- [53] M. Beissner, K. Herbinger, and G. Bretzel, "Laboratory diagnosis of Buruli ulcer disease," *Future Microbiol.*, vol. 5, no. 3, pp. 363–370, 2010.
- [54] WHO, "LABORATORY DIAGNOSIS OF BURULI ULCER," Geneva, Switzerland, 2014.
- [55] S. A. Sakyi, S. Y. Aboagye, I. Darko Otchere, and D. Yeboah-Manu, "Clinical and laboratory diagnosis of buruli ulcer disease: A systematic review," *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, vol. 2016, p. 5310718, 2016.
- [56] K.-H. Herbinger *et al.*, "Comparative Study of the Sensitivity of Different Diagnostic Methods for the Laboratory Diagnosis of Buruli Ulcer Disease," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 48, no. 8, pp. 1055–1064, 2009.
- [57] V. Siegmund *et al.*, "Dry Reagent-Based Polymerase Chain Reaction Compared with Other Laboratory Methods Available for the Diagnosis of Buruli Ulcer Disease," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 45, no. 1, pp. 68–75, 2007.
- [58] D. Affolabi *et al.*, "Effects of grinding surgical tissue specimens and smear staining methods on Buruli ulcer microscopic diagnosis," *Trop. Med. Int. Heal.*, vol. 13, no. 2, pp. 187–190, 2008.
- [59] D. Yeboah-Manu, A. Asante-Poku, K. Asan-Ampah, E. D. E. Ampadu, and G. Pluschke, "Combining PCR with microscopy to reduce costs of laboratory diagnosis of buruli ulcer," *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 85, no. 5, pp. 900–904, 2011.
- [60] Y. Stienstra *et al.*, "Analysis of an IS 2404 -Based Nested PCR for Diagnosis of Buruli Ulcer Disease in Regions of Ghana Where the Disease Is Endemic," vol. 41, no. 2, pp. 794–797, 2003.
- [61] M. Beissner *et al.*, "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.*, vol. 6, no. 8, p. e1756, Aug. 2012.
- [62] J. A. M. Fyfe *et al.*, "Development and Application of Two Multiplex Real-Time PCR Assays for the Detection of *Mycobacterium ulcerans* in Clinical and Environmental Samples," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 15, pp. 4733–4740, 2007.
- [63] D. Yeboah-Manu, T. Bodmer, S. Owusu, D. Ofori-adjei, G. Pluschke, and E. Mensah-quainoo, "Evaluation of Decontamination Methods and Growth Media for Primary Isolation of *Mycobacterium ulcerans* from Surgical Specimens Evaluation of Decontamination Methods and Growth Media for Primary Isolation of *Mycobacterium ulcerans* from Surgical Specimens," vol. 42, no. 12, pp. 5875–5877, 2004.

- [64] F. Portaels *et al.*, "Direct detection and identification of *Mycobacterium ulcerans* in clinical specimens by PCR and oligonucleotide- specific capture plate hybridisation," *J Clin Microbiol.*, vol. 35, no. 5, pp. 1097–1100, 1997.
- [65] R. Phillips *et al.*, "Sensitivity of PCR Targeting the IS 2404 Insertion Sequence of *Mycobacterium ulcerans* in an Assay Using Punch Biopsy Specimens for Diagnosis of Buruli Ulcer Sensitivity of PCR Targeting the IS 2404 Insertion Sequence of *Mycobacterium ulcerans* in an Assay," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 43, no. 8, pp. 3650–3656, 2005.
- [66] J. Guarner *et al.*, "Histopathologic features of *Mycobacterium ulcerans* infection," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 9, no. 6, pp. 651–656, 2003.
- [67] G. Bretzel *et al.*, "A stepwise approach to the laboratory diagnosis of Buruli ulcer disease," *Trop. Med. Int. Heal.*, vol. 12, no. 1, pp. 89–96, 2007.
- [68] M. Sarpong-Duah *et al.*, "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.*, vol. 11, no. 7, p. e0005695, Jul. 2017.
- [69] V. Siegmund *et al.*, "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.*, vol. 43, no. 1, pp. 271–276, 2005.
- [70] M. Beissner *et al.*, "Loop-Mediated Isothermal Amplification for Laboratory Confirmation of Buruli Ulcer Disease—Towards a Point-of-Care Test," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 9, no. 11, pp. 1–14, 2015.
- [71] D. K. de Souza, C. Quaye, L. Mosi, P. Addo, and D. A. Boakye, "A quick and cost effective method for the diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* infection," *BMC Infect. Dis.*, vol. 12, no. 1, p. 8, Dec. 2012.
- [72] Z. K. Njiru, D. Yeboah-Manu, T. P. Stinear, and J. A. M. Fyfe, "Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium ulcerans* by use of a loop-mediated isothermal amplification test.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 50, no. 5, pp. 1737–41, May 2012.
- [73] A. Ablordey *et al.*, "Detection of *Mycobacterium ulcerans* by the Loop Mediated Isothermal Amplification Method," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 6, no. 4, p. e1590, Apr. 2012.
- [74] A. Wadagni *et al.*, "Simple, Rapid *Mycobacterium ulcerans* Disease Diagnosis from Clinical Samples by Fluorescence of Mycolactone on Thin Layer Chromatography," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 9, no. 11, pp. 1–8, 2015.
- [75] G. Bretzel *et al.*, "Post-surgical assessment of excised tissue from patients with Buruli ulcer disease: Progression of infection in macroscopically healthy tissue," *Trop. Med. Int. Heal.*, vol. 10, no. 11, pp. 1199–1206, 2005.
- [76] J. M. Kanga, D. E. Kacou, A. Sangaré, Y. Dabila, N. H. Asse, and S. Djakeaux, "[Recurrence after surgical treatment of Buruli ulcer in Cote d'Ivoire].," *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, vol. 96, no. 5, pp. 406–9, Jan. 2003.
- [77] G. Amofah, S. Asamoah, and C. Afram-Gyening, "Effectiveness of Excision of Pre-Ulcerative Buruli Lesions in Field Situations in a Rural District in Ghana," *Trop. Doct.*, vol. 28, no. 2, pp. 81–83, Apr. 1998.
- [78] M. Debacker, J. Aguiar, C. Steunou, C. Zinsou, W. M. Meyers, and F. Portaels, "Buruli ulcer

- recurrence, Benin," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 11, no. 4, pp. 584–589, 2005.
- [79] WHO, "Buruli ulcer: progress report, 2004-2008.," Geneva, Switzerland, 2008.
- [80] M. A. Teelken *et al.*, "Buruli ulcer: Differences in treatment outcome between two centres in Ghana," *Acta Trop.*, vol. 88, no. 1, pp. 51–56, 2003.
- [81] K.-H. Herbinger *et al.*, "Excision of pre-ulcerative forms of buruli ulcer disease: A curative treatment?," *Infection*, vol. 37, no. 1, pp. 20–25, 2009.
- [82] S. Rondini, C. Horsfield, E. Mensah-quainoo, T. Junghanss, and S. Lucas, "Contiguous spread of *Mycobacterium ulcerans* in Buruli ulcer lesions analysed by histopathology and real-time PCR quantification of mycobacterial DNA," *J Pathol*, vol. 208, no. 1, pp. 119–28, 2006.
- [83] R. Phillips, S. Etuafu, K. Asiedu, P. Awuah, and M. Wansbrough-Jones, "Management of oedematous forms of *M. ulcerans* disease: the role of antibiotics. In: Report of the Seventh Advisory Group Meeting on Buruli Ulcer, 8–11 March 2004, Geneva, Switzerland," Geneva, 2004.
- [84] R. R. Yotsu, M. Richardson, and N. Ishii, "Drugs for treating Buruli ulcer (*Mycobacterium ulcerans* disease)," *Cochrane Database Syst. Rev.*, vol. 2018, no. 8, p. CD012118, Aug. 2018.
- [85] W. A. Nienhuis *et al.*, "Antimicrobial treatment for early, limited *Mycobacterium ulcerans* infection: a randomised controlled trial," *Lancet*, vol. 375, no. 9715, pp. 664–672, 2010.
- [86] R. O. Phillips *et al.*, "Clinical and Bacteriological Efficacy of Combination of Rifampicin and Streptomycin for 2 weeks followed by Rifampicin and Clarithromycin for 6 weeks for treatment of *Mycobacterium ulcerans* disease.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 58, no. 4, pp. 25–26, 2014.
- [87] K. Kibadi *et al.*, "Response to treatment in a prospective cohort of patients with large ulcerated lesions suspected to be Buruli Ulcer (*Mycobacterium ulcerans* Disease)," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 4, no. 7, p. e736, 2010.
- [88] A. Chauty *et al.*, "Oral treatment for *Mycobacterium ulcerans* infection: Results from a pilot study in Benin," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 52, no. 1, pp. 94–96, 2011.
- [89] M. Vogel *et al.*, "Local Heat Application for the Treatment of Buruli Ulcer: Results of a Phase II Open Label Single Center Non Comparative Clinical Trial," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 62, no. 3, pp. 342–350, 2015.
- [90] WHO, "GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2017," Geneva, Switzerland, 2017.
- [91] E. Cambau *et al.*, "Antimicrobial resistance in leprosy: results of the first prospective open survey conducted by a WHO surveillance network for the period 2009–15," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 24, no. 12, pp. 1305–1310, Mar. 2018.
- [92] C. M. Rumende, "Risk Factors for Multidrug-resistant Tuberculosis.," *Acta Med. Indones.*, vol. 50, no. 1, pp. 1–2, Jan. 2018.
- [93] WHO, "DRUG-RESISTANT TB SURVEILLANCE & RESPONSE,SUPPLEMENT GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2014," Geneva, Switzerland, 2014.
- [94] WHO, "Guidelines for global surveillance of drug resistance in leprosy," Geneva, Switzerland, 2009.
- [95] N. Honore and S. T. Cole, "Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*.,"

- Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 37, no. 3, pp. 414–8, Mar. 1993.
- [96] A. Telenti *et al.*, “Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*,” *Lancet (London, England)*, vol. 341, no. 8846, pp. 647–50, Mar. 1993.
- [97] G. P. Morlock, B. B. Plikaytis, and J. T. Crawford, “Characterization of spontaneous, In vitro-selected, rifampin-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, no. 12, pp. 3298–301, Dec. 2000.
- [98] J. Yue, W. Shi, J. Xie, Y. Li, E. Zeng, and H. Wang, “Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 5, pp. 2209–12, May 2003.
- [99] I. Ullah *et al.*, “Rifampicin resistance mutations in the 81 bp RRDR of *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using Xpert MTB/RIF in Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan: a retrospective study,” *BMC Infect. Dis.*, vol. 16, no. 1, p. 413, Aug. 2016.
- [100] B. R. Sapkota, C. Ranjit, K. D. Neupane, and M. Macdonald, “Development and evaluation of a novel multiple-primer PCR amplification refractory mutation system for the rapid detection of mutations conferring rifampicin resistance in codon 425 of the *rpoB* gene of *Mycobacterium leprae*,” *J. Med. Microbiol.*, vol. 57, no. Pt 2, pp. 179–84, Feb. 2008.
- [101] L. Marsollier *et al.*, “Isolation of three *Mycobacterium ulcerans* strains resistant to rifampin after experimental chemotherapy of mice,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 47, no. 4, pp. 1228–1232, 2003.
- [102] G. Canetti *et al.*, “MYCOBACTERIA: LABORATORY METHODS FOR TESTING DRUG SENSITIVITY AND RESISTANCE,” *Bull. World Health Organ.*, vol. 29, pp. 565–78, 1963.
- [103] M. Beissner *et al.*, “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.*, vol. 83, no. 5, pp. 1059–65, Nov. 2010.
- [104] F. S. Sarfo *et al.*, “Clinical efficacy of combination of rifampin and streptomycin for treatment of *Mycobacterium ulcerans* disease,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, no. 9, pp. 3678–85, Sep. 2010.
- [105] Q. B. Vincent *et al.*, “Clinical epidemiology of laboratory-confirmed Buruli ulcer in Benin: A cohort study,” *Lancet Glob. Heal.*, vol. 2, no. 7, pp. e422–e430, 2014.
- [106] B. J. Kim *et al.*, “Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*),” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 37, no. 6, pp. 1714–1720, 1999.
- [107] K. L. Huber, “Labordiagnostik der Buruli Ulkus Erkrankung in Togo/Westafrika,” Ludwig-Maximilians-Universität zu München, 2013.
- [108] A. J. Saah and D. R. Hoover, “‘Sensitivity’ and ‘Specificity’ Reconsidered: The Meaning of These Terms in Analytical and Diagnostic Settings,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 126, no. 1, p. 91, Jan. 1997.
- [109] G. Bretzel *et al.*, “External quality assurance for the laboratory diagnosis of Buruli ulcer disease in Ghana,” *Trop. Med. Int. Heal.*, vol. 11, no. 11, pp. 1688–1693, 2006.
- [110] H. Lee, H. E. Bang, G. H. Bai, and S. N. Cho, “Novel polymorphic region of the *rpoB* gene containing *Mycobacterium* species-specific sequences and its use in identification of mycobacteria,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 5, pp. 2213–2218, 2003.

- [111] B. J. Kim *et al.*, "Differentiation of Mycobacterial Species by PCR-Restriction Analysis of DNA ( 342 Base Pairs ) of the RNA Polymerase Gene (*rpoB*)," vol. 39, no. 6, pp. 2102–2109, 2001.
- [112] T. R. Gingeras *et al.*, "Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic Mycobacterium DNA arrays.," *Genome Res.*, vol. 8, no. 5, pp. 435–48, May 1998.
- [113] J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, and T. L. Madden, "Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction.," *BMC Bioinformatics*, vol. 13, no. 1, p. 134, Jun. 2012.
- [114] A. Untergasser *et al.*, "Primer3--new capabilities and interfaces.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 15, p. e115, Aug. 2012.
- [115] T. Koressaar and M. Remm, "Enhancements and modifications of primer design program Primer3.," *Bioinformatics*, vol. 23, no. 10, pp. 1289–91, May 2007.
- [116] H. Mizuguchi, M. Nakatsuji, S. Fujiwara, M. Takagi, and T. Imanaka, "Characterization and application to hot start PCR of neutralizing monoclonal antibodies against KOD DNA polymerase.," *J. Biochem.*, vol. 126, no. 4, pp. 762–8, Oct. 1999.
- [117] Merck, "KOD Hot Start DNA Polymerase | 71086." [Online]. Available: [http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/KOD-Hot-Start-DNA-Polymerase,EMD\\_BIO-71086](http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/KOD-Hot-Start-DNA-Polymerase,EMD_BIO-71086). [Accessed: 11-Jan-2019].
- [118] NCBI, "GenBank: Accession No. YP\_904864.1." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>. [Accessed: 10-May-2019].
- [119] M. Jansson *et al.*, "Comparison of two assays for molecular determination of rifampin resistance in clinical samples from patients with Buruli ulcer disease.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 52, no. 4, pp. 1246–9, Apr. 2014.
- [120] Y. T. Barogui *et al.*, "Towards Rational Use of Antibiotics for Suspected Secondary Infections in Buruli Ulcer Patients," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 7, no. 1, p. e2010, 2013.
- [121] M. Jansson *et al.*, "Comparison of two assays for molecular determination of rifampin resistance in clinical samples from patients with Buruli ulcer disease," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 52, no. 4, pp. 1246–1249, 2014.
- [122] L. Eckhart, J. Bach, J. Ban, and E. Tschachler, "Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 271, no. 3, pp. 726–30, May 2000.
- [123] T. Yoshii, K. Tamura, T. Taniguchi, K. Akiyama, and I. Ishiyama, "[Water-soluble eumelanin as a PCR-inhibitor and a simple method for its removal].," *Nihon Hoigaku Zasshi*, vol. 47, no. 4, pp. 323–9, Aug. 1993.
- [124] D. Anthwal, R. K. Gupta, M. Bhalla, S. Bhatnagar, J. S. Tyagi, and S. Haldar, "Direct Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in Sputum Samples from Tuberculosis Patients by High-Resolution Melt Curve Analysis.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 55, no. 6, pp. 1755–1766, 2017.
- [125] W. Li *et al.*, "Real-Time PCR and High-Resolution Melt Analysis for Rapid Detection of Mycobacterium leprae Drug Resistance Mutations and Strain Types," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 50, no. 3, pp. 742–753, Mar. 2012.
- [126] A. Telenti *et al.*, "Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in Mycobacterium

tuberculosis: a blind study at reference laboratory level.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 35, no. 3, pp. 719–23, Mar. 1997.

## 7 Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Professor Dr. med. G. Bretzel für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die Heranführung an die Thematik, und die wissenschaftliche Betreuung während der Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit.

Dr. med. M. Beissner möchte ich herzlich für seine fachkundige und kompetente Betreuung in allen Aspekten meiner Dissertation danken. Durch seine Nähe zu den detaillierten Abläufen im Labor und sein fundiertes Wissen über die Buruli Ulcus Erkrankung stellte er eine unverzichtbare Schlüsselrolle bei der fortlaufenden Planung meiner Dissertation, Durchführung meiner Experimente, und Verfassung dieser Arbeit dar.

Herrn Professor Dr. med. Löscher möchte ich für die Leitung des Instituts und seine Unterstützung während meiner Tätigkeit als Doktorand danken. Durch sein beeindruckendes Fachwissen und seine Zugänglichkeit für Ratschläge wurde mein Wissen im Bereich der Tropenmedizin auch über den Rahmen meiner Dissertationsarbeit erweitert.

Herrn Professor Dr. med. M. Hölscher danke ich herzlichst für die Übernahme der Betreuung meiner Dissertationsarbeit sowie für die finale Begutachtung und Bewertung der Arbeit.

Ich möchte mich bei Dr. F. Battke für seine kompetente Unterstützung bei den molekularbiologischen Aspekten meiner Arbeit bedanken.

Ich bedanke mich bei allen labortechnischen Assistenten welche mich bei der praktischen Umsetzung meiner Arbeit mit Rat und Tat unterstützt haben. Meinen besonderen Dank an Erna Fleischmann, Kerstin Helfrich und Carolin Mengele. Ebenfalls meinen Dank an alle ärztlichen und wissenschaftlichen Mitarbeiter der AITM welche durch ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit mein Projekt unterstützt haben. Insbesondere Dominik Müller, welcher zeitgleich mit mir in der Buruli AG tätig war, möchte ich für die Lösung vieler gemeinschaftlicher Herausforderungen und seine humorvolle Art danken.

Ich möchte mich auch bei Franz Wiedemann und seinem engagierten Team bei der DAHW in Togo bedanken. Durch ein unvergessliches Praktikum bei der DAHW habe ich die Buruli Ulcus Erkrankung in ihrer klinischen Ausprägung kennen gelernt und somit das Verständnis für diese Erkrankung außerhalb des Labors vertiefen können.

Ich möchte nicht zuletzt ein großes Dankeschön an meine Familie und insbesondere an meine Frau Nooshin, meinen Sohn Leonhard und meine Eltern entrichten. Trotz vieler schwieriger Momente haben sie mich immer ermutigt weiter zu machen.

## 8 Curriculum Vitae

Name: Moritz Karl Jansson  
Geburtsdatum / -ort: 19.10.1987 / München  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### **Ausbildung:**

2007 Abitur in Starnberg  
2010 Erstes Staatsexamen der Humanmedizin an der Semmelweis Universität in Budapest  
2011 Beginn einer medizinischen Promotionsarbeit am Tropeninstitut der Ludwig-Maximilians-Universität München.  
2013 Praktikum bei der Deutschen Lepra- und Tuberkulosehilfe e. V. (DAHW) in Togo  
2013 ERASMUS an der Université de Strasbourg, Frankreich  
2014 Zweites Staatsexamen der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck  
2015 Chirurgisches Tertial des praktischen Jahres an der Université de Montpellier in Frankreich  
2015 Internistisches Tertial des praktischen Jahres im Mayo General Hospital in Castlebar, Irland  
2015 Drittes Staatsexamen der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck  
2016 Beginn der Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin an der Universitätsmedizin Rostock  
2018 Beginn des Studienganges MSc Epidemiologie an der London School of Hygiene and Tropical Medicine, London (Fernstudium).  
2019 Beginn der Weiterbildung zum Facharzt für Mikrobiologie, Virologie und Infektionsepidemiologie an der Universitätsmedizin Rostock

## 9 Anhang

### 9.1 Anleitung zur Nukleinsäurepräparation aus Kulturmaterial und klinischen Proben

Arbeitsschritt	Beschreibung
1) Inaktivierung	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Die Proben werden vor der DNA Extraktion in Cell Lysis Solution (700 µl, FNAs: 300 µl) (siehe 3.1.3) gelagert.</li><li>2. Inkubation der Proben bei 95 °C (20 min.), dann Abkühlung auf RT.</li></ol>
2) Zell-Lyse	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Zugabe von 10 µl Proteinase K je Probe.</li><li>2. Inkubation bei 55 °C und 35 %iger Schüttelgeschwindigkeit über Nacht.</li><li>3. Inaktivierung der Proteinase K (siehe 3.1.3) mittels Inkubation bei 80°C. (20 min.) und anschließender Abkühlung auf RT.</li><li>4. Zugabe von je 15 µl Lysozym (siehe 3.1.1) und Inkubation bei 37 °C für 60 min. (Bei Wundabstrichen wurde die Lysozymbehandlung der Proteinase K Lyse vorgezogen.).</li></ol>
3) Protein Fällung	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Lagerung der Proben auf Eis für 5 min.</li><li>2. Zugabe von 230 µl Protein Precipitation Solution (siehe 3.1.3) je Probe, erneute Lagerung der Proben auf Eis (5 min.).</li><li>3. Zentrifugieren (5 min.) bei 13.000 rpm.</li></ol>
4) DNA Fällung	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Überführung des Überstands in neue Reagenzgefäße sowie Zugabe von 700 µl Isopropanol (siehe 3.1.1) und 2 µl Glykogen (siehe 3.1.1).</li><li>2. Zentrifugieren (5 min.) bei 13.000 rpm, Verwerfen des Überstands.</li><li>3. Zugabe von 700 µl Ethanol (siehe 3.1.1).</li><li>4. Zentrifugieren (5 min.) bei 13.000 rpm, Verwerfen des Überstands.</li><li>5. Pellets in offenen Reaktionsgefäßen bei RT lufttrocknen lassen.</li></ol>
5) DNA Hydratation	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Zugabe von je 200µl DNA Hydratation Solution (siehe 3.1.3) (FNAs: 50 µl).</li><li>2. bei 55°C (15min.) bei Schüttelfrequenz von 35 % bis zur vollständigen Auflösung der Pellets im Thermomixer inkubieren.</li></ol>
6) Konservierung der Proben	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Die Kurzzeitlagerung der DNA Extrakte kann bis zu max. 7 Tage im Kühlschrank bei 4 °C erfolgen.</li><li>2. Die Langzeitlagerung bei -20 °C.</li></ol>

**Tabelle 16: SOP zur Nukleinsäurepräparation aus Kulturmaterial und klinischen Patientenproben.**  
Modifiziertes Protokoll von Qiagen [69] [107].

## 9.2 Anleitung zur Aufreinigung der Cycle-Sequencing Produkte und Vorbereitung für die anschließende Sequenzierung:

Arbeitsschritt	Beschreibung																																																																																																
1) Aufreinigung der Cycle-Sequencing Produkte mittels Dye Ex 2.0 Spin Kit von Quiagen (siehe 3.1.3)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Auffüllen der Cycle-Sequencing Produkte mit 15 µl Aqua dest. auf 20 µl.</li> <li>- Dye Ex Filter werden eine viertel Drehung aufgedreht, gevortext und unten geöffnet, dann auf Dye Ex Tubes setzen.</li> <li>- Dye Ex Tubes zentrifugieren (3 min, 2700 rpm).</li> <li>- Dye Ex Tubes verwerfen.</li> <li>- Dye Ex Filter auf neues 2 ml Eppendorf-Tube setzen (nicht im Kit enthalten).</li> <li>- Sequenzier-Reaktion (20 µl) schräg auf das Dye Ex Gel (im Filter) pipettieren.</li> <li>- Zentrifugieren (3 min, 2700 rpm).</li> <li>- Filter verwerfen. Im Eluat befindet sich das aufgereinigte Produkt.</li> </ul>																																																																																																
2) Fällung der aufgereinigten Produkte	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 20 µl aufgereinigtes Cycle-Sequencing Produkt + 60 µl 97 % Ethanol (1 Teil Produkt : 3 Teile Ethanol) 15 min. inkubieren bei RT.</li> <li>- Zentrifugieren (3 min, 13.000 rpm), Überstand verwerfen.</li> <li>- 40 µl 70 % Ethanol zugeben.</li> <li>- Zentrifugieren (3 min, 13.000 rpm), Überstand verwerfen.</li> <li>- 40 µl 70 % Ethanol zugeben Zentrifugieren (3 min, 13.000 rpm), Überstand verwerfen.</li> <li>- Tubes ca. 45 min bei RT trocknen lassen bis der Alkohol verdunstet ist.</li> </ul>																																																																																																
3) Eluierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Die DNA aus vorangegangenem Schritt mit 12 µl LiChorSolv. Wasser und 13 µl HiDi-Formamid eluieren.</li> <li>- Endvolumen 25 µl.</li> </ul>																																																																																																
4) Belegung der Optical Plates	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Einpipettieren von 25 µl pro Reaktion in ABI Platten (optical plates) (vom Helmholtz FZ zur Verfügung gestellt. Die Optical Plates enthalten 96 Kavitäten. Pro Lauf werden 48 Reaktionen gelesen. Das Sequenziergerät beginnt mit den ungeraden Kavitäten [A1-H9] – es müssen immer alle 48 Kavitäten eines Lesevorgangs gefüllt sein). Graphische Darstellung der Optical Plates:</li> </ul> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tbody> <tr><td>A1</td><td>A2</td><td>A3</td><td>A4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>A12</td></tr> <tr><td>B1</td><td>B2</td><td>B3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>B12</td></tr> <tr><td>C1</td><td>D2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>C12</td></tr> <tr><td>D1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>D12</td></tr> <tr><td>E1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>E12</td></tr> <tr><td>F1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>F12</td></tr> <tr><td>G1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>G12</td></tr> <tr><td>H1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>H12</td></tr> </tbody> </table> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ist die Anzahl der Reaktionen geringer als 48, Auffüllung der übrigen Kavitäten mit jeweils 25 µl LiChroSolv-Wasser.</li> <li>- Versiegelung der Platten mit Septen (Helmholtz FZ).</li> <li>- Gekühlter Transport zum Helmholtz FZ.</li> </ul>	A1	A2	A3	A4								A12	B1	B2	B3									B12	C1	D2										C12	D1											D12	E1											E12	F1											F12	G1											G12	H1											H12
A1	A2	A3	A4								A12																																																																																						
B1	B2	B3									B12																																																																																						
C1	D2										C12																																																																																						
D1											D12																																																																																						
E1											E12																																																																																						
F1											F12																																																																																						
G1											G12																																																																																						
H1											H12																																																																																						
5) Anfertigung des Sample-sheets	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Proben wie folgt ins Samplesheet (.txt-Datei) eintragen: angefangen von oben nach unten, nur Probenname ohne A1, B1, C1 etc. (zunächst die ungeraden, dann die geraden Kavitäten; als Sonderzeichen nur “_“ erlaubt; ist eine Kavität leer Zeile frei lassen).</li> <li>2. Versendung des Samplesheet per Email mit Angaben über die Proben ans Helmholtz-Institut.</li> </ol>																																																																																																

Tabelle 17: Anleitung zur Aufreinigung der Cycle Sequencing Produkte und zum Befüllen der Optical Plates.

### 9.3 Übersicht der verschiedenen getesteten Primer-Paare zur Etablierung von Assay B

Primer <sup>a</sup>	Sequence (5'-3') <sup>b</sup>	Ausschlusskriterien <sup>c</sup>	CG-Gehalt (%)	Schmelztemperatur (°C)	Anzahl Basenpaare	Länge (Bp)	Bemerkung
MuB-F_01	AGC CCA TCA CCA GCT CGA C	+	63.2	62.0	19	611 bp	Unspezifische Amplifikate an klinischen Proben
MuB-R_01	GTG GAT CTC GTC GGA AAC G		59.9	58.4	19		
MuB-F_02	CCA GCC CAT CAC CAG CTC	+	66.7	59.0	18	612 bp	Mangelnde Sensitivität
MuB-R_02	TGG ATC TCG TCG GAA ACG		55.6	56.8	18		
MuB-F_02	CCA GCC CAT CAC CAG CTC	+	66.7	59.0	18	611 bp	Unspezifische Amplifikate an klinischen Proben
MuB-R_03	GGA TCT CGT CGG AAA CGA		55.5	56.4	18		
MuB-F_05	AAT ACC TGG TCC GCT TGC	+	55,6	57.4	18	556 bp	Unspezifische Amplifikate an Kulturmaterial
MuB-R_4	ATC TCG TCG GAA ACG ACC		55,6	56.8	18		
MuB-F_6	CCA TCA CCA GCT CGA CGC	+	66.7	60.0	18	747 bp	Unspezifische Amplifikate an klinischen Proben
MuB-R_5	CCT CTG ACG AGG GCA CGT A		63.1	61.0	18		
MuB-F_7	CAT CAC CAG CTC GAC GCT	-	61.1	59.8	18	606 bp	Gute Spezifität und Sensitivität
MuB-R_2	TGG ATC TCG TCG GAA ACG		55.6	56.8	18		
MuB-F_7	CAT CAC CAG CTC GAC GCT	+	61.1	59.8	18	605 bp	Mangelnde Sensitivität
MuB-R_03	GGA TCT CGT CGG AAA CGA		55.5	56.4	18		
MuB-F_8	CAT CAC CAG CTC GAC GC	+	64.7	58.1	17	606 bp	Mangelnde Sensitivität
MuB-R_2	TGG ATC TCG TCG GAA ACG		55.6	56.8	18		

**Tabelle 18: Forward- und Reverse-Primer und daraus abgeleitete Primer-Paare welche im Rahmen der Etablierung von Assay B getestet wurden.**

Die Tabelle zeigt sämtliche Primer, welche die thermodynamischen Kriterien des Primerdesigns erfüllt haben (siehe 3.2.8.1.1.2) und während der Etablierung von Assay B getestet wurden. <sup>a</sup> F: Forward-Primer, R: Reverse Primer. Die getesteten Primer wurden zur Unterscheidung nummeriert. <sup>b</sup> Primer-Sequenz vom 5' zum 3' Ende. <sup>c</sup> Ausschlusskriterien welche in Etablierung von Assay B festgelegt wurden (siehe 3.2.8.1.4); +: Ausschlusskriterien erfüllt, -: Ausschlusskriterien nicht erfüllt. MuB-F\_7 und MuB-R\_2 wurden für Assay B verwendet.



## ***Eidesstattliche Versicherung***

*Jansson, Moritz*

*Ich erkläre hiermit an Eides statt,*

*dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel*

*„Etablierung und Validierung eines optimierten molekularen Assays zur Bestimmung von Rifampicin-Resistenzen 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.*

*Rostock, 21.07.2020*

*Moritz Jansson*

*Ort, Datum*

*Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand*