

Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
der Medizinischen Poliklinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Leiter: Prof. Dr. med. T. Löscher

**Entwicklung, Validierung und klinische Anwendung einer
diagnostischen Methode
zum Nachweis von *Mycobacterium ulcerans*
unter tropischen Bedingungen**

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

**vorgelegt von
Vera Siegmund
aus Bad Wildungen**

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter Prof. Dr. Th. Löscher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Haas
Prof. Dr. J. Prinz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. G. Bretzel

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2006

Teile der vorliegenden Dissertation wurden mit Genehmigung des Promotionsausschusses der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität vorab veröffentlicht bzw. sind zur Publikation eingereicht.

2004: Siegmund V., O. Adjei, P. Racz, C. Berberich, E. Klutse, F. van Vloten, T. F. Kruppa, B. Fleischer, and G. Bretzel.: A dry reagent based PCR as a novel tool for the laboratory confirmation of clinically diagnosed *M. ulcerans* disease in Ghana. J Clin Microbiol 43(1): 271-6.

2005: Bretzel G., V. Siegmund, P. Racz, F. van Vloten, F. Ngos, W. Thompson, P. BIASON, O. Adjei, B. Fleischer, J. Nitschke: Post-surgical assessment of excised tissue from patients with Buruli ulcer disease: progression of infection in macroscopically healthy tissue. Trop Med Int Health 10(11): 1199-206.

2006: Bretzel G., V. Siegmund, J. Nitschke, K.H. Herbinger, R. Thompson, E. Fleischmann, B. Fleischer, O. Adjei: External Quality Assurance for the Laboratory Diagnosis of Buruli Ulcer Disease in Ghana. Trop Med Int Health.

Zur Veröffentlichung angenommen

2006: Bretzel, G., V. Siegmund, J. Nitschke, W. Thompson, E. Klutse, R. Thompson, K. Asamoah-Opore, P. Racz, F. van Vloten, C. Berberich, T. Kruppa, E. Ampadu, B. Fleischer, O. Adjei: Implementation of a diagnostic system for *M. ulcerans* in Ghana. Trans R Soc Trop Med Hyg.

Zur Veröffentlichung eingereicht

2006: Bretzel G., V. Siegmund, J. Nitschke, K.H. Herbinger, W. Thompson, E. Klutse, K. Crofts, W. Massavon, S. Etuaful, R. Thompson, K. Asamoah-Opore, P. Racz, F. van Vloten, C. Berberich, T. Kruppa, E. Ampadu, B. Fleischer, O. Adjei. A step-wise approach to the laboratory diagnosis of Buruli ulcer disease. Trop Med Int Health

Zur Veröffentlichung eingereicht

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v); % (w/v)	Volumenprozent; Gewichtsprozent
μ; m	Mikro; milli
AFB	Säurefeste Stäbchenbakterien (<i>Engl.: acid fast bacilli</i>)
amp	Ampicillin
BNI	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
bp	Basenpaar(e)
CLS	Zell-Lysepuffer (<i>Engl.: cell lysis solution</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-Hyd	DNA Hydration Solution, DNA-Hydratationslösung
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HCl	Salzsäure
IE	Internationale Einheit
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
KCCR	Kumasi Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine
KCl	Kaliumchlorid
LB	Luria Bertani
M	Molar
NaCl	Natrium-Chlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatpuffer (<i>Engl.: phosphat buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Engl.: polymerase chain reaction</i>)
PPS	Proteinpräzipitationslösung (<i>Engl.: protein precipitation solution</i>)
RT	Raumtemperatur
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
üN	Über Nacht
UV	ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>Engl.: world health organisation</i>)
X- Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Mycobacterium ulcerans	1
1.2	Geschichtliche Hintergründe zum Buruli-Ulkus	2
1.3	Epidemiologie und Transmission	3
1.4	Klinisches Bild und Differentialdiagnostik	4
1.5	Behandlung und Therapie des Buruli-Ulkus	5
1.6	Labordiagnostik des Buruli-Ulkus	6
2	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG.....	7
3	MATERIAL UND METHODEN	9
3.1	Material	9
3.1.1	Chemikalien	9
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	10
3.1.3	Reagenzsysteme („Kits“)	10
3.1.4	Nukleinsäuren	10
3.1.4.1.1	pT-Adv-Plasmidvektor	10
3.1.4.1.2	Mycobacterium ulcerans-Plasmid pMU5147	10
3.1.4.1.3	Weitere Nukleinsäuren	11
3.1.4.1.4	Oligonukleotide	11
3.1.5	Lösungen, Puffer und Medien	11
3.1.5.1.1	Transportmedium für Mykobakterien	11
3.1.5.1.2	LB-Festmedium (41) für E. coli	12
3.1.5.1.3	LB-Agar zur Blau-Weiss-Selektion für E. coli	12
3.1.5.1.4	LB-Flüssigmedium für E.coli	12
3.1.5.1.5	SOC-Medium, X-Gal-Mix, IPTG-Lösung	12
3.1.5.1.6	Puffer für die Histopathologie	12
3.1.6	Geräte	12
3.1.7	Bakterienstämme	13
3.1.7.1	E. coli-Stamm für die „TA“-Klonierung	13
3.1.7.2	M. ulcerans-Stämme	13
3.1.8	Diagnostisches Probenmaterial	13
3.2	Methoden	15
3.2.1	Entwicklung, Validierung und Etablierung einer an tropische Bedingungen adaptierten PCR zum Nachweis von M. ulcerans	15
3.2.1.1	Geplanter Ablauf	15
3.2.1.2	Nukleinsäurepräparation	15
3.2.1.2.1	Nukleinsäurepräparation aus Kulturmaterial	16
3.2.1.2.2	Nukleinsäurepräparation aus Patientenmaterial	16
3.2.1.3	Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Produkten (64)	16
3.2.1.4	Isolierung von PCR-Produkten aus Agarosegelen	17
3.2.1.5	„TA“-Klonierung von PCR-Produkten (64)	17
3.2.1.5.1	Ligation von PCR-Produkten in Vektoren (64)	17
3.2.1.5.2	Transformation (64)	17
3.2.1.5.3	Kultivierung der transformierten Bakterien	17
3.2.1.5.4	Blau-Weiss-Selektion (64, 75, 91)	18
3.2.1.6	Plasmid-Minipräparation	18
3.2.1.7	Photometrische Plasmid-DNA-Quantifizierung	18

3.2.1.8	PCR (64)	18
3.2.1.8.1	PCR zur Überprüfung der Klonierung.....	18
3.2.1.8.2	Diagnostische PCR-Methoden	19
3.2.1.8.2.1	Standard-PCR (72)	19
3.2.1.8.2.2	DRB-PCR.....	20
3.2.2	Durchführung einer vergleichenden Studie aller zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden zum Nachweis von <i>M. ulcerans</i>	20
3.2.2.1	Geplanter Ablauf, Studienaufbau	20
3.2.2.2	Einschlusskriterien	20
3.2.2.3	Standardisierung der Probenentnahme	20
3.2.2.4	Aufbewahrung der Proben	22
3.2.2.5	Datenerfassung.....	22
3.2.2.6	Datendokumentation	22
3.2.2.7	Labormethoden zur Diagnose des Buruli-Ulkus	22
3.2.2.7.1	Mikroskopie.....	22
3.2.2.7.1.1	Ziehl-Neelsen-Färbung von AFB	22
3.2.2.7.1.2	Bewertung des Mikroskopie-Ergebnisses	23
3.2.2.7.2	Kultur	23
3.2.2.7.2.1	Dekontamination und Inokulation (87)	23
3.2.2.7.2.2	Bewertung der Kulturergebnisse	23
3.2.2.7.3	PCR	24
3.2.2.7.3.1	Bewertung der PCR-Ergebnisse	24
3.2.2.7.4	Histopathologie	24
3.2.2.7.4.1	Bewertung der Histopathologie-Ergebnisse (30).....	24
3.2.2.8	Ermittlung der diagnostische Endbefunde (Konsensus-Ergebnisse) von Mikroskopie und PCR	25
3.2.2.9	Ermittlung der diagnostischen Sensitivität.....	25
3.2.2.10	Interne Qualitätskontrolle	25
3.2.2.11	Externe Qualitätskontrolle (Engl.: <i>external quality assessment</i> , EQA)	25
3.2.2.11.1	Probenanzahl	26
3.2.2.11.2	Vorgehen	26
3.2.2.12	Statistische Analyse der Daten und bestimmte Parameter (6).....	26
3.2.2.13	Studienaufbau	28
3.2.2.14	Einschlusskriterien	28
3.2.2.15	Probenabnahmetechnik „Gradientensets“	28
3.2.2.16	Probenabnahmetechnik „Exzisionsrandsets“	28
3.2.2.17	Bewertung der Ergebnisse	29

4	ERGEBNISSE	30
4.1	Entwicklung und Validierung einer an tropische Bedingungen adaptierten PCR zum Nachweis von <i>M. ulcerans</i>	30
4.1.1	Präparation eines quantifizierten Plasmid-DNA-Standards	30
4.1.2	Entwicklung der DRB-PCR.....	30
4.1.2.1	Validierungsphase I der DRB-PCR	30
4.1.2.1.1	Allgemeine Spezifitätsüberprüfung	30
4.1.2.1.2	Allgemeine Sensitivitätsüberprüfung	30
4.1.2.1.3	Analytische Sensitivität beider Methoden.....	30
4.1.2.1.4	Inter-Assay-Übereinstimmungsrate.....	31
4.1.2.1.5	Diagnostische Sensitivität	31
4.1.2.2	Validierungsphase II der DRB-PCR: Pilotstudie unter tropischen Bedingungen	32
4.1.2.2.1	Inter-Assay-Übereinstimmungsrate.....	32
4.1.2.3	Diagnostische Sensitivität beider Methoden.....	33
4.1.3	Differentialdiagnostische Untersuchung der in beiden PCR-Methoden negativ getesteten Proben... 33	
4.2	Vergleichende Studie aller zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden	34
4.2.1	Vorarbeiten	34
4.2.2	Beschreibung des Patientenkollektivs.....	34
4.2.3	Vergleich der diagnostischen Methoden	35
4.2.3.1	Mikroskopie	36
4.2.3.1.1	Konsensus-Ergebnisse (diagnostische Endbefunde)	36
4.2.3.1.1.1	Abstriche	36
4.2.3.1.1.2	Biopsien.....	36
4.2.3.1.2	Diagnostische Sensitivität der Methode Mikroskopie	37
4.2.3.2	Kultur	37
4.2.3.3	PCR.....	38
4.2.3.3.1	Inter-Assay-Übereinstimmungsrate, 1. Untersuchung.....	38
4.2.3.3.1.1	Abstriche	38
4.2.3.3.1.2	Biopsien.....	38
4.2.3.3.1.3	Diagnostische Sensitivität DRB-PCR und Standard-PCR.....	39
4.2.3.3.2	Konsensus-Ergebnisse, Inter-Assay-Übereinstimmungsrate, 2. Untersuchung.....	39
4.2.3.3.2.1	Abstriche	39
4.2.3.3.2.2	Biopsien.....	40
4.2.3.3.3	Diagnostische Sensitivität der Methode PCR.....	40
4.2.3.4	Histopathologie	41
4.2.3.5	Gegenüberstellung der diagnostischen Sensitivitäten von Mikroskopie und PCR.....	41
4.2.3.6	Sensitivität von Mikroskopie und DRB-PCR abhängig von Probenart und Läsionstyp	41
4.2.3.6.1	Prä-ulzerative Läsionen	42
4.2.3.6.1.1	Vergleich Mikroskopie und DRB-PCR der Biopsien.....	42
4.2.3.6.2	Ulzerative Läsionen.....	43
4.2.3.6.2.1	Vergleich Mikroskopie der Abstriche und Biopsien	43
4.2.3.6.2.2	Vergleich Mikroskopie und DRB-PCR der Abstriche	43
4.2.3.6.2.3	Vergleich DRB-PCR der Abstriche und DRB-PCR der Biopsien.....	44
4.2.3.6.2.4	Vergleich Mikroskopie und DRB-PCR der Biopsien.....	45
4.2.3.6.3	Diagnostischer Gewinn der nachfolgenden Anwendung verschiedener Diagnostik-Methoden.....	45
4.2.3.6.3.1	Prä-ulzerative Läsionen	45
4.2.3.6.3.2	Ulzerative Läsionen.....	45
4.2.3.7	Externe Qualitätskontrolle	46
4.2.3.7.1	Mikroskopie.....	46
4.2.3.7.2	PCR	48
4.3	Untersuchung der Ausbreitung von <i>M. ulcerans</i> in die angrenzende Umgebung des Geschwürs	51
4.3.1	„Gradienten“-Proben.....	51
4.3.2	Exzisionsränder	52

5	DISKUSSION	53
5.1	Aussagekraft und Zuverlässigkeit der Untersuchungen.....	53
5.1.1	Entwicklung, Validierung und Etablierung einer an tropische Bedingungen adaptierten PCR zum Nachweis von <i>M. ulcerans</i>	53
5.1.2	Durchführung einer vergleichenden Studie aller zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden zum Nachweis von <i>M. ulcerans</i>	55
5.1.3	Untersuchung der Ausbreitung von <i>M. ulcerans</i> in die angrenzende Umgebung des Geschwürs	62
5.2	Vergleich mit anderen Untersuchungen.....	63
5.2.1	Entwicklung, Validierung und Etablierung einer an tropische Bedingungen adaptierten PCR zum Nachweis von <i>M. ulcerans</i>	63
5.2.2	Durchführung einer vergleichenden Studie aller zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden zum Nachweis von <i>M. ulcerans</i>	63
5.2.3	Untersuchung der Ausbreitung von <i>M. ulcerans</i> in die angrenzende Umgebung des Geschwürs	65
5.3	Schlussfolgerungen	67
5.3.1	Entwicklung, Validierung und Etablierung einer an tropische Bedingungen adaptierten PCR zum Nachweis von <i>M. ulcerans</i>	67
5.3.2	Durchführung einer vergleichenden Studie aller zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden zum Nachweis von <i>M. ulcerans</i>	67
5.3.3	Untersuchung der Ausbreitung von <i>M. ulcerans</i> in die angrenzende Umgebung des Geschwürs	68
6	ZUSAMMENFASSUNG	70
7	LITERATURVERZEICHNIS	73
8	ANHANG	78
9	DANKSAGUNG	82
10	CURRICULUM VITAE	83

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.	<i>Mycobacterium ulcerans</i>	1
Abb. 2.	Zellwandaufbau der Mykobakterien	2
Abb. 3.	Geographische Verteilung der Buruli-Ulkus-Erkrankung.....	3
Abb. 4.	Prä-ulzerative und ulzerative Stadien der Buruli-Ulkus-Erkrankung	5
Abb. 5.	Probenabnahmetechnik bei Ulkus und Nodule.	21
Abb. 6.	Probenabnahme der a) „Gradientensets“ und b) „Exzisionsrandsets“	29
Abb. 7.	Vergleichsstudie, Patientenkollektiv, Verteilung Läsionstyp in Behandlungszentren	35
Abb. 8.	pT-Adv-Plasmidvektor	80
Abb. 9.	Insertionsposition des Amplifikates innerhalb des pT-Adv-Plasmidvektors und Zielsequenzen der Primer zur Überprüfung der Insertion	80
Abb. 10.	Ergebnisauswertung Agarosegelelektrophorese.....	80
Abb. 11.	BU1-Formular	81
Abb. 12.	Patienten-Daten-Erfassungs-Formular	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Validierungsphase I der DRB-PCR, <i>Inter-Assay</i> -Übereinstimmung, Abstriche	31
Tabelle 2	Validierungsphase I der DRB-PCR, <i>Inter-Assay</i> -Übereinstimmung, Biopsien	31
Tabelle 3	Validierungsphase I der DRB-PCR, Diagnostische Sensitivität, Abstriche	32
Tabelle 4	Validierungsphase I der DRB-PCR, Diagnostische Sensitivität, Biopsien	32
Tabelle 5	Validierungsphase II der DRB-PCR, <i>Inter-Assay</i> -Übereinstimmungsrate, Abstriche	32
Tabelle 6	Validierungsphase II der DRB-PCR, <i>Inter-Assay</i> -Übereinstimmungsrate, Biopsien..	32
Tabelle 7	Validierungsphase II der DRB-PCR, Diagnostische Sensitivität, Abstriche.....	33
Tabelle 8	Validierungsphase II der DRB-PCR, Diagnostische Sensitivität, Biopsien	33
Tabelle 9	Vergleichsstudie, Patientenkollektiv, Gesamtanzahl erhaltener und ausgewerteter Proben	34
Tabelle 10	Vergleichsstudie, Patientenkollektiv, Verteilung Läsionstyp in Behandlungszentren	35
Tabelle 11	Vergleichsstudie, Konsensus-Ergebnisse, Abstriche	36
Tabelle 12	Vergleichsstudie, Konsensus-Ergebnisse, Biopsien	37
Tabelle 13	Vergleichsstudie, Kulturergebnisse, Abstriche.....	37
Tabelle 14	Vergleichsstudie, Kulturergebnisse, Biopsien	38
Tabelle 15	Vergleichsstudie, <i>Inter-Assay</i> -Übereinstimmungsrate, 1. Untersuchung, Abstriche...	38
Tabelle 16	Vergleichsstudie, <i>Inter-Assay</i> -Übereinstimmungsrate, 1. Untersuchung, Biopsien...	39
Tabelle 17	Vergleichsstudie, diagnostische Sensitivitäten DRB-PCR und Standard PCR.....	39
Tabelle 18	Vergleichsstudie, Konsensus-Ergebnisse DRB-PCR und Standard PCR, Abstriche...	40
Tabelle 19	Vergleichsstudie, Konsensus-Ergebnisse DRB-PCR und Standard PCR, Biopsien	40
Tabelle 20	Vergleichsstudie, Diagnostische Sensitivitäten Mikroskopie, DRB- und Standard-PCR, „Methode PCR“	41
Tabelle 21	Vergleichsstudie, Ergebnisse Mikroskopie und DRB-PCR: Biopsien, prä-ulzerative Läsionen.....	42
Tabelle 22	Vergleichsstudie, Ergebnisse Mikroskopie: Abstriche und Biopsien, ulzerative Läsionen.....	43
Tabelle 23	Vergleichsstudie, Ergebnisse Mikroskopie und DRB-PCR: Abstriche, ulzerative Läsionen.....	44
Tabelle 24	Vergleichsstudie, Ergebnisse DRB-PCR: Abstriche und Biopsien, ulzerative Läsionen	44
Tabelle 25	Vergleichsstudie, Ergebnisse Mikroskopie und DRB-PCR: Biopsien, ulzerative Läsionen.....	45
Tabelle 26	Vergleichsstudie, diagnostischer Gewinn, nachfolgende Anwendung prä- und postoperativer Labormethoden	46
Tabelle 27	Vergleichsstudie, Mikroskopie, 1. Untersuchung Test-Labor bezogen auf Endergebnis Kontroll-Labor	47
Tabelle 28	Vergleichsstudie, Mikroskopie, Ergebnisse Test-Labor 2. Untersuchung der Proben mit diskrepanten Ergebnissen des Test-Labors bezogen auf Endergebnis Kontroll-Labor	47
Tabelle 29	Vergleichsstudie, Mikroskopie, Ergebnisse Test-Labor nach 2. Untersuchung der Proben mit diskrepanten Ergebnissen des Test-Labors bezogen auf Endergebnis Kontroll-Labor	48
Tabelle 30	Vergleichsstudie, PCR, 1. Untersuchung Test-Labor bezogen auf Endergebnis Kontroll-Labor	49
Tabelle 31	Vergleichsstudie, PCR, Ergebnisse Test-Labor 2. Untersuchung der Proben mit diskrepanten Ergebnissen bezogen auf Endergebnis Kontroll-Labor	49
Tabelle 32	Vergleichsstudie, PCR, Ergebnisse Test-Labor nach 2. Untersuchung der Proben mit diskrepanten Ergebnissen bezogen auf Endergebnis Kontroll-Labor.....	50
Tabelle 33	Zur Etablierung der DRB-PCR verwendete Mykobakterien-Stämme und -DNA.....	78
Tabelle 34	PCR- und Histopathologie-Ergebnisse, „Gradienten-Proben“	79

1 Einleitung

1.1 *Mycobacterium ulcerans*

Mycobacterium ulcerans, der Erreger der Buruli-Ulkus-Erkrankung, zählt zur Familie der *Mycobacteriaceae*. Mykobakterien sind grampositive, unbewegliche, nicht Sporen bildende, säurefeste Stäbchenbakterien, leben aerob und wachsen in Form unregelmäßig geformter Zellen bis zu einer Größe von durchschnittlich 2 – 3 µm Länge und 0,2 - 0,4 µm Breite.



Abb. 1. *Mycobacterium ulcerans*

Mycobacterium ulcerans ist ein aerob lebendes, nicht Sporen bildendes säurefestes Stäbchenbakterium von durchschnittlich 2 -3 µm Länge und 0,2 - 0,4 µm Breite. (Bild-Quelle: <http://www.ukl.uni-freiburg.de/med/med6/kfrwww/tuberkulose.pdf>)

In vitro kann *M. ulcerans* im eierhaltigen Löwenstein-Jensen-Medium kultiviert werden. Das Temperaturoptimum von *Mycobacterium ulcerans* beträgt 32°C, das pH-Optimum liegt bei pH 5,4 bis pH 7,4 (40, 76, 87).

Das besondere morphologische Merkmal aller Mykobakterien ist ihre lipidhaltige Zellwand, die bis zu 60 % ihres Trockengewichts betragen kann (42). Die Zellwandzusammensetzung schützt Mykobakterien gegen zahlreiche Bakterien schädigende Noxen, bestimmt die relative Undurchlässigkeit für viele Farbstoffe und ist verantwortlich für die Hydrophobizität der Bakterien. Auch Virulenz, intrazelluläre Persistenz sowie Resistenz gegen Säuren, Laugen und einfache Desinfektionsmittel gehen auf die lipidreiche Zellwand zurück (40). Die charakteristische Säureresistenz dient in der klassischen Bakteriologie als diagnostisches Kriterium für die Identifikation von Mykobakterien (sog. Säurefestigkeit). Mykobakterien werden daher auch als „AFB“ (Engl.: *acid fast bacilli*) bezeichnet (87).

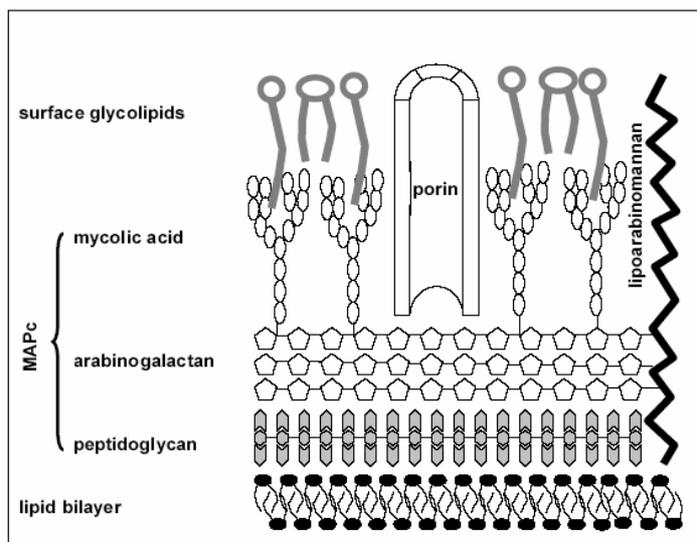


Abb. 2. Zellwandaufbau der Mykobakterien

An die N-Acetylmuraminsäure des Peptidoglykans sind Arabinogalaktankomplexe gebunden, die aus linearen Galaktose-Strängen bestehen und mit Arabinose-Ketten verzweigt sind. An diese Komplexe sind Mykolsäuren gebunden. (Bild-Quelle: <http://edoc.hu-berlin.de>)

Man unterteilt Mykobakterien in schnell wachsende (Generationszeit eine bis vier Stunden) und langsam wachsende (Generationszeit sechs bis 24 Stunden) Gattungen. *Mycobacterium ulcerans* zählt mit einer Generationszeit von 20 Stunden zu den langsam wachsenden Mykobakterien (40). Im Gegensatz zu anderen Mykobakterien produziert *Mycobacterium ulcerans* ein gewebedestruktiv wirkendes Toxin (14, 22, 27-29, 80).

1.2 Geschichtliche Hintergründe zum Buruli-Ulkus

Schon die 1897 von Sir Albert (85) als rätselhafte Hauterkrankung in Uganda beschriebene Geschwürbildung führt man heute auf das Buruli-Ulkus zurück. Erste bestätigte Fälle der Infektion beschrieb MacCallum bei australischen Feldarbeitern 1948 (43). MacCallum benannte die Krankheit nach dem australischen Ort Bairnsdale, in dem die Krankheit auftrat, als „Bairnsdale ulcer“. Dem Erreger gab er entsprechend den Namen *Bairnsdale bacillus*“ (1, 31, 49). Im Zuge seiner späteren Zuordnung zu den Mykobakterien erhielt der Erreger dann den Namen *Mycobacterium ulcerans*. 1961 wurden auch mykobakterielle Hautulzera auf dem übrigen afrikanischen Kontinent bekannt (23). Die betroffene Region in Uganda liegt unweit des Nils und heißt Buruli. Der Name dieses Gebietes prägte später auch den Namen der Infektionskrankheit Buruli-Ulkus (10).

1.3 Epidemiologie und Transmission

Das Buruli-Ulkus stellt heute nach Tuberkulose und Lepra die weltweit dritthäufigste mykobakterielle Infektionskrankheit dar (3, 19) und tritt hauptsächlich in den tropischen und subtropischen Sumpf- und Feuchtgebieten Latein Amerikas, Afrikas und im Westpazifik auf (11, 65, 71, 81). Im Einzelnen sind Fallberichte aus Angola (85), Australien (49, 83), Benin (20, 32), Burkina Faso (58), Kamerun (53), China (26), der Elfenbeinküste (34, 46), der Demokratischen Republik Kongo (8, 36), aus Französisch Guayana (85), Gabon (13), Ghana (3, 69), Guinea (5), Indien (25), Indonesien (86), Japan (86), Kiribati (86), Liberia (50), Malawi (89), Malaysia (52), Mexiko (15), Nigeria (37, 54), Papua Neu Guinea (86), Peru (84), Sierra Leone (50), Sri Lanka (65), Sudan (5), Surinam (86), Uganda (16, 23) und Togo (48, 68) bekannt (9, 36). Abbildung 3 verdeutlicht die geographische Verbreitung des Buruli-Ulkus weltweit.

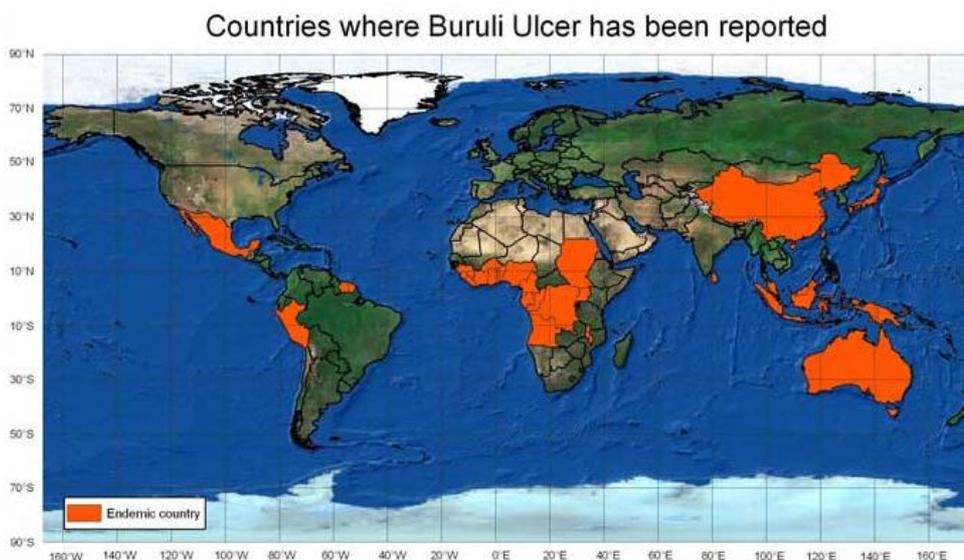


Abb. 3. Geographische Verteilung der Buruli-Ulkus-Erkrankung

Geographische Verteilung der Buruli-Ulkus-Erkrankung. Orange eingefärbte Staaten stellen Endemiegebiete dar. (Bild-Quelle: www.who.int/buruli/country/en/index.html)

Die Informationen über Inzidenz- & Prävalenzdaten sind sehr unpräzise. Die Patienten leben meist in abgelegenen, ländlichen Gegenden und haben oft keinen Zugang zu öffentlichen Gesundheitssystemen. Weiterhin ist die Erkrankung in vielen Endemiegebieten nicht meldepflichtig. Das vielfältige klinische Bild der Erkrankung kann zudem leicht zu Fehldiagnosen führen. Labormethoden zur Bestätigung der klinischen Verdachtsdiagnose sind in den meisten endemischen Ländern nicht verfügbar. Aus einigen Ländern existieren jedoch vage Fallzahlen: In der Elfenbeinküste sind 22.000 Buruli-Ulkus-Erkrankungen seit 1978

bekannt, dies betrifft in einigen Regionen bis zu 16 % der Bevölkerung, in anderen Ländern wurden Prävalenzraten von über 20 % beschrieben (3) in den Hochendemiegebieten Ghanas betrug die Prävalenz im Jahre 1999 150,8/100.000 Einwohner (3). Rätselhaft ist insbesondere die Transmission von *M. ulcerans*, die trotz weitreichender Untersuchungen bislang noch nicht geklärt werden konnte. Es gibt Hinweise darauf, dass das Buruli-Ulkus eine aus der Umwelt erworbene Infektion ist, die Bakterien durch kontaminiertes Wasser, Schmutz oder die natürliche Vegetation übertragen werden und durch kleinere Hautverletzungen in das Unterhautfettgewebe eindringen (82). Andere Quellen berichten von einer möglichen Übertragung durch Insekten (38, 45, 61).

1.4 Klinisches Bild und Differentialdiagnostik

Ausgehend von der aktuellen WHO-Definition bezeichnet das Buruli-Ulkus eine infektiöse Erkrankung, die vom subkutanen Fettgewebe ausgeht und auf die bedeckende Haut übergreift. Die Erkrankung äußert sich im zunächst prä-ulzerativen Stadium als schmerzlose noduläre oder papuläre Hautschwellung, als Plaque und/oder Ödem, woraus sich innerhalb weniger Tage großflächige Ulzera mit charakteristisch unterminierten Rändern entwickeln können. Die Erkrankung wird häufig von Sekundärinfektionen begleitet (82), einschließlich aller Folgeerscheinungen wie Abszedierung (12), Vernarbung (21, 39) oder systemischer Ausbreitung (Sepsis) (7). Trotz niedriger Mortalität können schwere Folgekomplikationen auftreten. Durch Selbstheilungsprozesse oder durch zu spät eingeleitete chirurgische Therapie kann es zu Kontrakturen und Deformationen (7, 39, 77, 82), verbunden mit schweren Funktionseinschränkungen der betroffenen Extremitäten kommen (2, 18, 55, 70, 79). Abbildung 4 zeigt verschiedene Stadien der Buruli-Ulkus-Erkrankung.

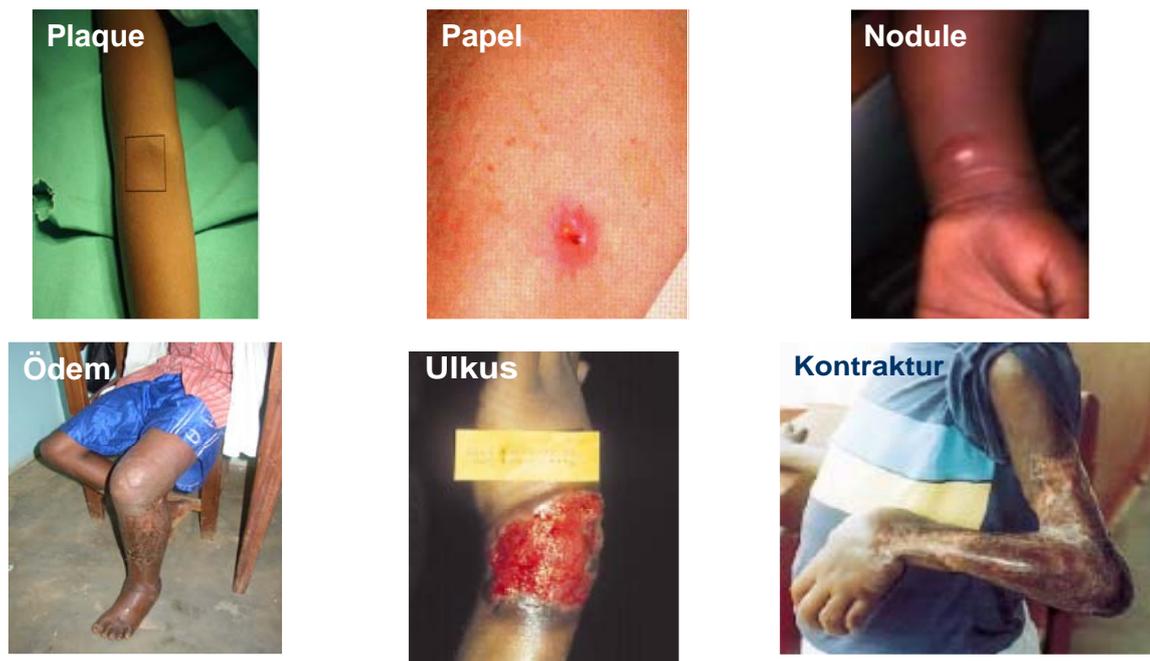


Abb. 4. Prä-ulzerative und ulzerative Stadien der Buruli-Ulkus-Erkrankung

Oben: prä-ulzeratives Krankheitsstadium mit Plaque, Papel und Nodule. Unten: Ödem und ulzeratives Krankheitsstadium. Kontraktur als Folgekomplikation.

Innerhalb der Mykobakteriosen sind vor allem die Lepra und die Hauttuberkulose sowie Infektionen der Haut durch andere nichttuberkulöse Mykobakterien von großer differentialdiagnostischer Bedeutung. Noduläre Formen müssen außerdem verlässlich von Onchozerkomen, Abszessen, Lipomen oder vergrößerten Lymphknoten unterschieden werden, ulzerative Stadien können leicht mit kutaner Leishmaniose, Mykosen, Neoplasmen oder tropischen Ulzera verwechselt werden (87).

1.5 Behandlung und Therapie des Buruli-Ulkus

Eine wirkungsvolle antibiotische Behandlungsmöglichkeit des Buruli-Ulkus ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht verfügbar. Die Behandlung erfolgt vorwiegend chirurgisch und geht bei ulzerativen Läsionen infolge der notwendigen Exzisionen mit dem Verlust großflächiger Hautbereiche einher (35, 85). Die Ausdehnung der Exzision wird allein durch die Erfahrung des Chirurgen und seine subjektive makroskopische Beurteilung des Gewebes bestimmt. Abhängig von der chirurgischen Technik wurden Rezidivraten von bis zu 32 % beschrieben (2, 19, 20, 33, 73). Bislang existieren keinerlei chirurgische Standards darüber, inwieweit eine Exzision in makroskopisch „gesund aussehendes“, an die Läsion angrenzendes Gewebe kurativ ist.

Neuere Untersuchungen an zuvor mit *Mycobacterium ulcerans* infizierten Mäusen berichten

über die erfolgreiche Behandlung der Ulzera durch Kombinationsbehandlung von Aminoglykosiden (Amikacin oder Streptomycin) und Rifampicin (24, 44, 62, 74). Die WHO empfiehlt deshalb zur Reduktion von Ödemen die Gabe von Rifampicin und Streptomycin (24, 74, 90). Ein vorbeugender Effekt durch Bacille-Calmette-Guérin-Impfung konnte festgestellt werden (4, 78).

1.6 Labordiagnostik des Buruli-Ulkus

Zur Diagnostik des Buruli-Ulkus aus Abstrichen und Biopsien stehen derzeit vier Methoden zur Verfügung: der Nachweis von säurefesten Stäbchenbakterien durch die Mikroskopie Ziehl-Neelsen gefärbter Präparate, die Kultur, die Histopathologie sowie die PCR. Anhand von Mikroskopie und Kultur kann lediglich ein Mykobakterium-Gattungsnachweis erbracht werden bei - abhängig von der Qualität des Untersuchungsmaterials - geringer Sensitivität und Spezifität. Durch Histopathologie kann der Nachweis durch die Untersuchung von Biopsien im Hinblick auf *M. ulcerans*-typische histopathologische Gewebsveränderungen erfolgen, die PCR stellt einen speziesspezifischen Nachweis dar (30, 87).

Mycobacterium ulcerans ist nicht auf der Hautoberfläche nachweisbar, sondern ausschließlich in der Subkutis, je nach Stadium der Erkrankung im Zentrum einer prä-ulzerativen Läsion oder am Rande des nekrotischen Anteils der Ulzera.

Aktuelle WHO-Richtlinien erfordern zwei positive Labortests, um einen Buruli-Ulkus-Verdachtsfall zweifelsfrei bestätigen zu können. Ein diagnostischer „Gold-Standard“ existiert nicht (87).

2 Problemstellung und Zielsetzung

Aufgrund der unter 1.4 beschriebenen klinischen Variabilität kann die klinische Diagnose des Buruli-Ulkus nur durch die Laborbestätigung verlässlich gesichert werden. Diagnostische Labormethoden sind im Hinblick auf die erschwerte Anwendung unter tropischen Bedingungen in der Regel auf wenig sensitive Nachweismethoden wie die Mikroskopie Ziehl-Neelsen gefärbter Präparate oder die Kultur beschränkt. Die Mikroskopie stellt zwar eine rasch zu erlernende, wenig zeitaufwändige Methode dar, bietet aber nur geringe Sensitivität. Die Kultivierung von *M. ulcerans* zu diagnostischen Zwecken ist aufgrund der sehr langen Generationszeit der Bakterien nicht zu empfehlen.

Zur Durchführung sensitiverer Nachweismethoden wie PCR und Histopathologie fehlt in Endemiegebieten meist die technische Ausstattung sowie erfahrene, in diesen Methoden ausgebildetes Laborpersonal. Eine histopathologische Untersuchung erfordert beispielsweise eine über Jahre erworbene Erfahrung in der Beurteilung der charakteristischen Gewebeveränderungen. Die PCR-Technik wird abgesehen von fehlender an tropische Bedingungen angepasster Laborausstattung, der relativ umfangreichen Anzahl der zu dieser Technik benötigten Reagenzien, deren schwierig einzuhaltende Aufbewahrungs- und Handhabungsvoraussetzungen und der bei der Methode erforderlichen Sorgfalt im Hinblick auf DNA-Kontaminationen in Endemiegebieten nicht durchgeführt.

Die genaue Differenzierung der gefundenen Erreger ist jedoch von entscheidender diagnostischer und differentialdiagnostischer Wichtigkeit, da sie mit direkten therapeutischen Konsequenzen verbunden ist. Die Anwendung der PCR zur Diagnostik des Buruli-Ulkus erscheint daher aus zwei Gründen wünschenswert: Erstens ermöglicht die PCR eine speziesspezifische Detektion, zweitens besitzt sie eine exzellente Sensitivität.

Ziele dieser Arbeit waren:

- 1. die Entwicklung und Validierung einer an tropische Bedingungen adaptierten PCR zum Nachweis von *M. ulcerans*, die im Routinebetrieb eines Labors in einem Buruli-Ulkus-Endemiegebiet eingesetzt werden kann.**

Eine solche PCR setzt voraus, dass sie unabhängig von Strom- und Kühlketten durchzuführen ist und Reagenzien verwendet, deren Lagerung und Transport auch bei hoher Luftfeuchtigkeit und hoher Raumtemperatur möglich ist. Die Durchführung sollte auch für Laborpersonal ohne molekularbiologische Vorbildung leicht erlernbar sein, sowie die finanziellen Möglichkeiten des Gesundheitssystems der Buruli-Ulkus endemischen Region nicht überlasten.

- 2. die Durchführung einer vergleichenden Studie aller zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden zum Nachweis von *M. ulcerans***

Begleitend dazu sollte eine Logistik für diagnostische Proben entwickelt werden, die standardisierte Kriterien zur Probenabnahme, zum Probentransport und zur Probenverarbeitung beinhalten sollte. Weiterhin sollten Maßnahmen der Qualitätskontrolle der diagnostischen Tests entwickelt und angewandt werden.

- 3. die Untersuchung der Ausbreitung von *M. ulcerans* in die angrenzende Umgebung des Geschwürs**

Diese Untersuchung sollte im Hinblick auf die Erarbeitung chirurgischer Richtlinien zur maximal nötigen und trotzdem kurativen Exzisionsweite dienen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose Electrophoresis Grade	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, München
<i>Aqua ad injectabilia</i>	Braun, Melsungen
Bacto-Tryptone	Fa. Merck, Darmstadt
BBL™MGIT™ PANTA Antibiotika-Supplement	BD Diagnostic Systems, Heidelberg
DNA-Probenauftragspuffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dubos Broth Base	BD Diagnostic Systems, Heidelberg
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Fa. Roth, Karlsruhe
Ethanol p. A.	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung 1 %	Carl-Roth, Karlsruhe
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glykogen	Gentra Systems, Minneapolis, USA
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Karbolfuchsinlösung	Roth, Karlsruhe
Löwenstein-Jensen-Medium	Heipha, Eppelheim
Lysozym	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Perkin-Elmer, Weiterstadt
Methylenblau	Roth, Karlsruhe
N-Acetyl-L-Cystein	Sigma, München
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
PBS	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma, München
TBE-Puffer	Applichem, Darmstadt
Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Tris-Base	Sigma, München

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialie

Einmal-Pinzette
 Einmal-Skalpell
 Falcon-Gefäße, 15 ml und 50 ml
 Handschuhe
 Abstrichtupfer
 Oberflächendesinfektionsmittel
 Pipettenspitzen: Filter Tips 10 µl und 20 µl
 Pipettenspitzen: Filter Tips 200 µl und 1000 µl
 Reaktionsgefäße 1,7 ml und 2 ml

Bezugsquelle

Servoprax GmbH, Wesel
 B.Braun, Melsungen
 Sarstedt, Nümbrecht
 Kimberly-Clark, Koblenz
 Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
 Schülkes & Mayr, Norderstedt
 Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
 Biozym Diagnostik GmbH, Hess.
 Oldendorf
 Roth, Karlsruhe

3.1.3 Reagenzsysteme („Kits“)

Anwendung	Reagenzsystem	Bezugsquelle
DNA-Extraktion	Genomic DNA Purification Kit	Gentra Systems, Indianapolis, USA
DRB-PCR	<i>PuReTaq Ready-To Go-PCR-Beads</i>	Amersham Biosciences, Freiburg
Gelextraktion	NucleoSpin [®] Extract 2 in 1	Machery Nagel, Düren
Plasmidpräparation	NucleoSpin [®] Plasmid-Kits	Machery-Nagel, Düren
Standard-PCR	AmpliTaq Gold with GeneAmp 10X PCR Buffer II and MgCl ₂ Solution	Applied Biosystems, Frankfurt
„TA“-Klonierung	AdvanTAge PCR Cloning Kit	Clontech, Palo Alto, Kalifornien, USA

3.1.4 Nukleinsäuren

3.1.4.1.1 pT-Adv-Plasmidvektor

Bei der „TA“-Klonierung (3.2.1.5) wurde zur Inserierung von PCR-Produkten der pT-Adv-Plasmidvektor verwendet. Die Plasmidkarte des Vektors ist in Abb. 8 im Anhang gezeigt.

3.1.4.1.2 *Mycobacterium ulcerans*-Plasmid pMU5147

Bei der Etablierung der DRB-PCR wurde eine photometrisch quantifizierte Plasmid-DNA-Lösung (3.2.1.7) als Positiv-DNA verwendet.

3.1.4.1.3 Weitere Nukleinsäuren

Nukleinsäure	Bezugsquelle
“Gene Ruler” 100 bp DNA-Leiter	MBI Fermentas, Heidelberg
dNTPs	Perkin-Elmer, Weiterstadt
DNA-Extrakte von <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> und <i>Micrococcus spp.</i>	Zur Verfügung gestellt durch das Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Mikrobiologische Zentraldiagnostik, PCR-Labor, Hamburg,
DNA-Extrakt <i>M. leprae</i>	Zur Verfügung gestellt durch Dr. Paul Klatser, Königliches Tropeninstitut Amsterdam

3.1.4.1.4 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung	Bezugsquelle
#MU5	AGC GAC CCC AGT GGA TTG GT	<i>Sense</i> -Primer der IS 2404-PCR	TibMolbiol, Berlin
#MU6	CGG TGA TCA AGC GTT CAC GA	<i>Antisense</i> -Primer IS 2404-PCR	TibMolbiol, Berlin
#M13F	AAA CAG CTA TGA CCA TG	M13-Plasmidprimer (<i>Sense</i> -Primer)	TibMolbiol, Berlin
#M13(-40)	GTT TTC CCA GTC ACG A	M13-Plasmidprimer (<i>Antisense</i> -Primer)	TibMolbiol, Berlin

3.1.5 Lösungen, Puffer und Medien

Alle angegebenen Puffer, Lösungen und Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, in *Aqua ad injectabilia* angesetzt. Alle Medien wurden vor ihrer Verwendung, soweit nicht anders angegeben, autoklaviert (121 °C, 20 Minuten, 1,5 bar).

3.1.5.1.1 Transportmedium für Mykobakterien

1,3 g Dubos Broth Base, 10 ml Glycerin, 170 ml Wasser wurden autoklaviert und auf 45 °C abgekühlt. Zu je 4 ml des Mediums wurde 0,1 ml „PANTA“-Supplement (6000 IE Polymyxin B, 600 µg Amphotericin B, 2400 µg Nalidixinsäure, 600 µg Trimethoprim, 600 µg Azlocillin in 3 ml sterilem *Aqua ad injectabilia*) zugesetzt und steril abgefüllt. Das Dubos-Broth-Transportmedium war sechs Monate bei RT, bzw. 12 Monate bei 4 °C haltbar.

3.1.5.1.2 LB-Festmedium (41) für *E. coli*

Dem LB-Medium wurden 2 % (w / v) Agar zugefügt. Nach dem Autoklavieren wurde Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg / ml) zur Selektion zugesetzt. Jeweils 20ml LB_{Amp}-Agar wurden in sterile Petrischalen gegossen und bis zum Erkalten bei RT gelagert.

Der LB_{Amp}-Agar war bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C ca. einen Monat haltbar.

3.1.5.1.3 LB-Agar zur Blau-Weiss-Selektion für *E. coli*

Auf LB_{Amp}-Agar-Platten (3.1.5.1.2) wurden 952 µg IPTG und 1600 µg X-Gal aufgebracht. Die modifizierten LB_{Amp}-Agarplatten wurden zur Durchführung der Blau-Weiss-Selektion frisch hergestellt.

3.1.5.1.4 LB-Flüssigmedium für *E.coli*

1 % (w / v) Trypton, 0,5 % (w / v) Hefeextrakt und 1 % (w / v) NaCl wurden in 1 L Wasser gelöst. Nach dem Autoklavieren wurde Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg / ml) zur Selektion zugesetzt. Je 3 ml des Mediums wurden in sterile Reagenzgläser gefüllt und mit einem Metalldeckel verschlossen. Das LB_{Amp}-Medium war bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C ca. einen Monat haltbar.

3.1.5.1.5 SOC-Medium, X-Gal-Mix, IPTG-Lösung

SOC-Medium	20 g / L Pepton, 5 g / L Hefeextrakt, 8,6 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 20 mM Glukose
X-Gal-Lösung	40 mg / ml in Dimethylformamid
IPTG	1 M in Wasser

3.1.5.1.6 Puffer für die Histopathologie

10 % Formalin	37 % Formaldehyd (= 100 % Formalin), 1:10 in Wasser verdünnt
----------------------	--

3.1.6 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Agarosegelelektrophorese Apparatur	Life Technologies, Karlsruhe
Bilddokumentations-System	UniEquip, Martinsried
Brutschrank	Memmert, Hamburg
Elektrophorese Spannungsgeber	Consort, Turnhout, Belgien
Gefrierschrank, Kühlschrank	Liebherr, Biberach an der Riss
Lichtmikroskop „Axioskop“	Zeiss, Jena

Gerät	Bezugsquelle
Lyophylle	Christ, Osterode
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Mikrozentrifuge „5417 C“	Eppendorf, Hamburg
Photometer Ultraspec 3000	Pharmacia Biotech, Freiburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe “Pipetus”	Hirschmann Laborgeräte, Herrenberg
Präzisionswaage “Scaltec SBA31”	Denver, Göttingen
Schüttelgerät Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Schüttelinkubator	Eppendorf, Hamburg
Sicherheitswerkbank	Heraeus, Hanau
Thermocycler „Primus“	MWG-Biotech, Ebersberg
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge “Biofuge pico”	Heraeus, Osterode

3.1.7 Bakterienstämme

3.1.7.1 *E. coli*-Stamm für die „TA“-Klonierung

E. coli Top10 F' F- *mcrA*, $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$, $\Phi lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, $\Delta(ara\text{-}leu)7697$, *galU*, *galK*, λ , *rpsL*, *nupG*

3.1.7.2 *M. ulcerans*-Stämme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *M. ulcerans*-Stämme sind in Tabelle 33 aufgeführt

3.1.8 Diagnostisches Probenmaterial

Die zur Entwicklung und Validierung einer an tropische Bedingungen adaptierten PCR zum Nachweis von *M. ulcerans* untersuchten Patientenproben wurden vom Dunkwa Governmental Hospital, Dunkwa-on-Offin, Dunkwa, Ghana, erhalten. Es wurden 16 Biopsien und 19 Abstriche von 19 klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus-Patienten während der Validierungsphase I (4.1.2.1) untersucht, Validierungsphase II (4.1.2.2) umfasste 30 Biopsien und 22 Abstriche von 30 Patienten mit klinischer Verdachtsdiagnose Buruli-Ulkus.

Zur Durchführung einer vergleichenden Studie aller zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden zum Nachweis von *M. ulcerans* unter tropischen Bedingungen wurden 204 Biopsien und 120 Abstriche (84 prä-ulzerative Läsionen, 120 ulzerative Läsionen) von 204

Patienten mit klinischer Verdachtsdiagnose Buruli-Ulkus untersucht. Die Patientenproben wurden in Zusammenarbeit mit den folgenden Krankenhäusern erhalten: Dunkwa Governmental Hospital, Dunkwa-on-Offin, Dunkwa, Ghana, Agogo Presbyterial Hospital, Agogo, Ghana, St. Martin's Catholic Hospital, Agroyesum, Ghana, Goaso Hospital, Goaso, Ghana.

Die Untersuchung zur Ausbreitung von *M. ulcerans* in die angrenzende Umgebung des Geschwürs wurde anhand des Exzisionsmaterials von 20 laborbestätigten Buruli-Ulkus-Patienten durchgeführt. Patientenproben wurden vom Agogo Presbyterial Hospital, Agogo, Ghana, und dem Hôpital de District, District de Santé d'Akonolinga, Akonolinga, Kamerun erhalten. Es wurden insgesamt 83 „Gradienten-Biopsien“ und 238 „Exzisionsrand-Biopsien“ untersucht (siehe Tabelle 34).

3.2 Methoden

3.2.1 Entwicklung, Validierung und Etablierung einer an tropische Bedingungen adaptierten PCR zum Nachweis von *M. ulcerans*

Ausgehend von der derzeitigen diagnostischen Standard-Referenz-PCR-Methode (3.2.1.8.2.1, im Folgenden als „Standard-PCR“ bezeichnet) wurde eine auf Trockenreagenzien basierende PCR, im Folgenden als „DRB-PCR“ (*dry reagent based PCR*) bezeichnet, entwickelt.

3.2.1.1 Geplanter Ablauf

Die Validierung der DRB-PCR sollte ausgehend von einem quantifizierten Plasmidstandard (pMU) erfolgen und der Gehalt des Plasmids in „Genom-Äquivalenten“ bestimmt werden, da die Zielsequenz der PCR innerhalb eines *multicopy* Elements liegt, von dem nach heutigem Kenntnisstand ca. 50 Kopien im Genom von *M. ulcerans* vorliegen.

Die DRB-PCR sollte gemäß 3.2.1.8.2.2 durchgeführt werden. Während Validierungsphase I sollten neben einer allgemeinen Spezifitäts- und einer Sensitivitätsprüfung die analytische sowie die diagnostische Sensitivität der DRB-PCR im Vergleich zur Standard-PCR bestimmt werden. Da zur Diagnose des Buruli-Ulkus derzeit kein labordiagnostischer Gold-Standard existiert, konnte nur die klinische Diagnose als Referenzgröße zugrunde gelegt werden. Die Ergebnisse beider PCR-Methoden sollten dann zur Bestimmung der *Inter-Assay*-Übereinstimmungsrate unabhängig von der diagnostischen Aussage miteinander verglichen werden. Durch beide Methoden negativ getestete Proben sollten einer histopathologischen Differentialdiagnostik unterzogen werden.

Danach sollte die DRB-PCR im Rahmen einer Pilotstudie (Validierungsphase II) am KCCR in Ghana unter tropischen Bedingungen eingesetzt und anhand von Proben von Patienten mit klinischer Verdachtsdiagnose Buruli-Ulkus unter tropischen Bedingungen getestet werden. Gleichzeitig sollten parallele Probensets durch die Standard-PCR unter Standard-Bedingungen untersucht werden. Die *Inter-Assay*-Übereinstimmungsrate zwischen beiden PCR-Methoden und die diagnostischen Sensitivitäten sollten ermittelt werden.

3.2.1.2 Nukleinsäurepräparation

Zur Extraktion von Nukleinsäure wurde ein modifiziertes Protokoll des Genomic DNA Purification Kit verwendet. CLS, PPS und DNA-Hyd. waren im Kit enthalten.

Neben dem Patienten- oder Kulturmaterial wurde bei jeder Extraktion eine negative Extraktionskontrolle mitgeführt, die kein *M. ulcerans*-Material enthielt.

3.2.1.2.1 Nukleinsäurepräparation aus Kulturmaterial

Eine Impföse *M. ulcerans*-Kulturmaterial wurde in 700 µl CLS überführt und zur Hitzeinaktivierung der Bakterien 20 Minuten bei 95 °C inkubiert. Danach wurde 10 µl Proteinase K zugegeben und üN bei 55 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms erfolgte eine Inkubation (80 °C, 20 Minuten), bevor 15 µl Lysozym zugegeben wurden und eine erneute Inkubation erfolgte (37 °C, 1 h). Anschließend wurde das Lysat fünf Minuten im Eisbad gelagert, die Proteine durch 230 µl PPS und erneute fünfminütige Inkubation im Eisbad gefällt und durch zweiminütige Zentrifugation bei 13.000 g pelletiert. Die im Überstand gelösten Nukleinsäuren wurden in ein neues Reagenzgefäß mit 700 µl Isopropanol und 2 µl Glykogen dekantiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 13.000 g wurde der Überstand abgegossen, das Pellet durch 700 µl 70 % Ethanol und einminütige Zentrifugation bei 13.000 g gewaschen und der Überstand entfernt. Das Pellet trocknete anschließend 45 Minuten bei RT, bevor es mit 200 µl DNA-Hyd. rehydriert wurde. Mehrmaliges Auf-und-Abpipettieren und eine Inkubation (55 °C, 15 Minuten) lösten das Pellet vollständig. Kulturmaterialextrakte wurden als Positivkontrolle bei der diagnostischen Anwendung der PCR-Methoden verwendet.

3.2.1.2.2 Nukleinsäurepräparation aus Patientenmaterial

Biopsien und Abstrichtupfer wurden schon bei der Probenentnahme in 700 µl CLS überführt (3.2.2.4). Die DNA-Extraktion aus Biopsien wurde gemäß 3.2.1.2.1 durchgeführt, allerdings wurde bei Abstrichtupfern zunächst 15 µl Lysozym zugegeben und inkubiert (37 °C, 1 h) und anschließend der Proteinase K-Verdau durchgeführt (1 0µl, 55°C, üN). Die weiteren Schritte erfolgten analog zur in 3.2.1.2.1 beschriebenen Extraktionsmethodik.

3.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Produkten (64)

Durch Agarose-Gelelektrophorese wurden PCR-Amplifikate aufgrund ihres bei neutralem pH-Wert negativ geladenen Phosphatrückgrates größenabhängig im elektrischen Feld aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht als sog. „Bande“ detektiert.

1,5 g Agarose wurden in 100 ml 1 X TBE-Puffer bis zum Lösen in einer Mikrowelle erhitzt. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurde Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 1 µg / ml) zugegeben, die Lösung zum Erstarren in einen Gelschlitten gegossen ein Gelkamm zur Herstellung der Probenauftragstaschen eingesetzt. Anschließend wurde das Gel in die mit TBE-Puffer gefüllte Agarose-Gelelektrophoresekammer überführt, die Amplifikate mit 1 / 6 Volumen DNA-Gelladepuffer gemischt und in die Probenauftragstaschen des Gels appliziert. Zur Bestimmung der Amplifikatlängen wurde zusätzlich ein 100 bp DNA-Längenstandard

aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 120 Volt für 45 Minuten durchgeführt.

3.2.1.4 Isolierung von PCR-Produkten aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung von Amplifikaten wurde die benötigte Bande zur Weiterverarbeitung durch „TA“-Klonierung (3.2.1.5) unter UV-Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die Isolierung erfolgte gemäß Herstellerangaben unter Verwendung des „NucleoSpin[®] Extract 2 in 1“ Gelextraktionskits.

3.2.1.5 „TA“-Klonierung von PCR-Produkten (64)

Bei der „TA“-Klonierung wurde die zielesequenzunabhängige, terminale Transferase-Aktivität der *Taq*-Polymerase ausgenutzt. Während der PCR generiert die Polymerase einzelne Desoxyadenosin-Überhänge am 3'-Ende der Amplifikate. Der pT-Adv besitzt Desoxythymin-Überhänge, so dass eine direkte Ligation ohne weiteren Restriktionsverdau zwischen Amplifikat und Vektor möglich ist.

Die „TA“-Klonierung umfasste PCR (3.2.1.8.2.1), Ligation (3.2.1.5.1), Transformation (3.2.1.5.2), Kultivierung transformierter Bakterien inklusive Blau-Weiss-Selektion (3.2.1.5.3, 3.2.1.5.4) und Überprüfung der Klonierung durch PCR (3.2.1.8.1). Es wurde das „AdvanTAge-PCR-Cloning-Kit“ der Firma Clontech verwendet. Alle Schritte, exklusive der zusätzlich durchgeführten Blau-Weiss-Selektion, erfolgten, soweit nicht anders angegeben, nach Angaben des Herstellers.

3.2.1.5.1 Ligation von PCR-Produkten in Vektoren (64)

Durch die Ligation wird die Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-OH zweier DNA-Fragmente durch das Enzym T4-Ligase katalysiert.

Den verwendeten pT-Adv-Plasmidvektor sowie die Zielsequenzen der Primer zur Überprüfung der Insertion zeigen Abb. 8 und Abb. 9 im Anhang.

3.2.1.5.2 Transformation (64)

Als Transformation wird die Übertragung von Plasmid-DNA in Bakterienzellen bezeichnet. Zur Transformation wurden TOP10F⁺ *Escherichia coli*-Bakterien (3.1.7.1) verwendet.

3.2.1.5.3 Kultivierung der transformierten Bakterien

Transformierte Bakterien wurden entsprechend der Herstellerangaben des „AdvanTAge-PCR-Cloning-Kits“ kultiviert. Anschließend wurden selektierte Kolonien steril in 3 ml LB_{Amp}-Medium überführt und inkubiert (37 °C, 12 h, 300 U / min). Die Kultivierung einer gesättigten Bakteriensuspension stellte die Basis für die Plasmidausbeute gemäß 3.2.1.6 dar.

3.2.1.5.4 Blau-Weiss-Selektion (64, 75, 91)

Die Blau-Weiss-Selektion diente zur Kontrolle der „TA“-Klonierung. Nach der Blau-Weiss-Selektion wurde das inserierte Amplifikat durch PCR überprüft (3.2.1.8.1). Das Prinzip der Blau-Weiss-Selektion beruht auf der Unterbrechung des innerhalb der *multiple cloning site* des Plasmidvektors liegenden *lacZ'*-Gens. *LacZ'* kodiert für das N-terminale α -Fragment der β -Galactosidase. Das Enzym ist nur durch Zusammenwirken des α -Fragments mit dem C-terminalen ω -Fragment der β -Galaktosidase aktiv (α -Komplementation (91)) während beide Fragmente allein keine β -Galaktosidase-Aktivität besitzen. Das intakte *lacZ'*-Gen kann nur abgelesen bzw. das α -Fragment synthetisiert werden, wenn der Induktor Galaktose oder ein Analogon wie z.B. IPTG vorhanden ist. Ist das Substratanalogon X-Gal zugegen, wird dieses gespalten, es entsteht ein blaues Abbauprodukt. Unterbleibt die Bildung von β -Galactosidase, weil das *lacZ'*-Gen durch die Insertion eines DNA-Fragments inaktiviert wurde, erscheint ein Bakterienklon weiß, wird das Enzym gebildet, erscheint ein Bakterienklon blau.

3.2.1.6 Plasmid-Minipräparation

Die Plasmidpräparation wurde mit Hilfe des NucleoSpin[®] Plasmid-Kits gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.1.7 Photometrische Plasmid-DNA-Quantifizierung

Der Gehalt der gemäß 3.2.1.6 präparierten Plasmid-DNA- wurde photometrisch bestimmt. Die Nukleinsäurekonzentration wurde ausgehend vom Wert der Optischen Dichte (OD) der Plasmid-DNA-Lösung unter UV-Lichtdurchfluss ($\lambda = 260 \text{ nm}$) berechnet. Aus dem Quotienten der $OD_{260\text{nm}}$ zu $OD_{280\text{nm}}$ ließ sich außerdem eine Aussage über die Proteinkontamination der Lösung treffen. Eine proteinfreie Lösung weist ein Verhältnis $OD_{260\text{nm}} / OD_{280\text{nm}}$ von 1,8 - 2,0 auf. Die Konzentration einer Plasmid-DNA-Lösung berechnet sich zu: $c = A_{260} \times 50 \times d [\mu\text{g} / \text{ml}]$, wenn $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}} = 1,8$ bis 2,0 ($A_{260\text{nm}}, A_{280\text{nm}} =$ Absorption bei 260 nm, 280 nm, $d =$ Verdünnungsfaktor). 1 $OD_{260\text{nm}}$ entspricht dabei 50 μg DNA / ml.

3.2.1.8 PCR (64)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur spezifischen Vermehrung (Amplifikation) von DNA-Sequenzen aus einem heterogenen Nukleinsäuregemisch (51).

3.2.1.8.1 PCR zur Überprüfung der Klonierung

Diese PCR wurde nach der Blau-Weiss-Selektion zum Ausschluss religierter Plasmidvektoren

der „TA“-Klonierung durchgeführt. Alle zu testenden Kolonien aus 3.2.1.5 wurden steril auf eine LB_{Amp}-Agarplatte überführt und bei 37 °C 12 Stunden inkubiert. Der an der Pipettenspitze verbliebene Rest des Koloniematerials wurde in 200 µl Wasser überführt und durch Inkubation (80 °C, 20 Minuten) zum partiellen Zellaufschluss gebracht. 2 µl dieser Klonzell-Suspension wurden analog zu 3.2.1.8.2.1, allerdings unter Verwendung der Primer #M13F und #M13(-40), amplifiziert und mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.1.3) ausgewertet. Eine gelungene Klonierung wurde durch ein Amplifikat der Länge 707 bp angezeigt.

3.2.1.8.2 Diagnostische PCR-Methoden

M. ulcerans-Nukleinsäure wurde präpariert (3.2.1.2) und unverdünnt oder in Wasser verdünnt amplifiziert. 10 % (v / v) des Reaktionsvolumens wurde bei jeder PCR durch das DNA-Eluat erreicht. Zur internen Qualitätskontrolle wurden während der PCR neben der in 3.2.1.2 beschriebenen Extraktionskontrolle auch eine positive und eine negative PCR-Kontrolle prozessiert. Zur Feststellung von Inhibitionsvorgängen wurden Inhibitionskontrollen mitgeführt, die neben dem zu testenden DNA-Extrakt auch *M. ulcerans*-positives Material im Verhältnis 1:1 enthielten. Eine positive PCR-Reaktion erzeugte bei der Überprüfung mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.1.3) sowohl in der Testreaktion als auch in der Inhibitionskontrollreaktion eine Bande der Länge 492 bp. Negative PCR-Reaktionen zeigten keine Bande in der Testreaktion, aber eine deutliche Bande in der Inhibitionskontrollreaktion. Eine Probe galt als inhibiert, wenn sowohl in der PCR-Reaktion als auch in der Inhibitionskontrollreaktion keine Bande nachzuweisen war (vergl. Abb. 10).

3.2.1.8.2.1 Standard-PCR (72)

10 % (v / v) des Reaktionsendvolumens setzten sich aus PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl) zusammen, außerdem waren 2,5 mM MgCl₂, 1 U AmpliTaq-Gold-DNA-Polymerase, 200 µM jedes dNTPs, und 10 pmol der Primer #MU5 und #MU6 enthalten. Das Reaktionsendvolumen von 20 µl wurde durch Zugabe von *Aqua ad injectabilia* erreicht.

Zur Durchführung der Validierungsschritte wurde das Endvolumen der Standard-PCR (20 µl) dem für die „*PuReTaq Ready-To-Go-PCR-Beads*“ vorgeschriebenen Endvolumen (25 µl) angeglichen, um eine vergleichende Ergebnisinterpretation zu ermöglichen.

Die Amplifikation erfolgte nach einem initialen Denaturierungsschritt (95°C, 10 Minuten) für insgesamt 40 Zyklen bestehend aus Denaturierung (95 °C, 10 Sekunden), Primeranlagerung (Engl.: *Annealing*, 58 °C, 10 Sekunden) und Extension (72 °C, 30 Sekunden). Die Reaktion

endete mit einem terminalen Extensionsschritt (72 °C, 10 Minuten).

3.2.1.8.2.2 DRB-PCR

Vor der Durchführung der DRB-PCR wurden die Primer #MU5 und #MU6 in die Reaktionsgefäße überführt und lyophilisiert (66). Zur Entwicklung und späteren Routineanwendung der DRB-PCR wurden die „*PuReTaq Ready-To-Go-PCR-Beads*“ verwendet. Jedes *Bead* beinhaltet in einem Reaktionsendvolumen von 25 µl ein Reaktionsgemisch bestehend aus 10 mM Tris-HCl [pH 9,0], 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM jedes dNTPs und 2,5 U *PuRe-Taq*-DNA-Polymerase.

Die Amplifikation erfolgte in Analogie zu 3.2.1.8.2.1.

3.2.2 Durchführung einer vergleichenden Studie aller zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden zum Nachweis von *M. ulcerans*

3.2.2.1 Geplanter Ablauf, Studienaufbau

Von September 2003 bis Januar 2006 sollten unter Berücksichtigung der Einschlusskriterien (3.2.2.2) Abstrich- und Biopsieproben von 200 klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus-Verdachtsfällen aus ursprünglich zwei, später vier Behandlungszentren durch Kultur, Mikroskopie säurefester Stäbchenbakterien, PCR, DRB-PCR und Histopathologie in einem lokalen und einem externen Labor untersucht werden.

Die Patientenrekrutierung sollte mit Hilfe freiwilliger Helfer des ghanaischen Gesundheitssystems, so genannter „*village health worker*“ erfolgen, die zu Studienbeginn im Rahmen von Workshops im Erkennen von Buruli-Ulkus-Patienten geschult werden sollten. Jeder *village health* sollte fortan Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle aus seinem Heimatdorf in das nächstgelegene Behandlungszentrum begleiten. Nach der Vorstellung der Patienten im Behandlungszentrum sollte der behandelnde Arzt entscheiden, diese tatsächlich als Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle behandelt und in die Studie aufgenommen werden konnten.

3.2.2.2 Einschlusskriterien

Es wurden prä-ulzerative und ulzerative Läsionstypen in die Studie integriert. Die Dauer der Erkrankung sollte sechs Monate nicht übersteigen. Alle nicht den Probenentnahmekriterien gemäß 3.2.2.3 entsprechenden Patienten-Probensets konnten nicht in die Studie eingeschlossen werden und wurden von der Laboranalyse ausgeschlossen.

3.2.2.3 Standardisierung der Probenentnahme

Mit den operierenden Chirurgen wurde die Bedeutung und Notwendigkeit der

Standardisierung der Probenentnahme besprochen. Im Rahmen der vergleichenden Studie aller zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden zum Nachweis von *M. ulcerans* sollte zwingend auf identische Größe und Beschaffenheit des Probenmaterials geachtet werden.

Pro Patient wurden bei prä-ulzerativen Läsionen vier transkutane Biopsien (im Rahmen dieser Arbeit als „Biopsie“ bezeichnet) entnommen, die mittels Mikroskopie, Kultur, DRB-PCR, Standard-PCR sowie Histopathologie untersucht wurden. Bei ulzerativen Läsionen wurden zusätzlich 3 Wundabstriche (im Rahmen dieser Arbeit als „Abstrich“ bezeichnet) durch Mikroskopie, Kultur, DRB-PCR sowie Standard-PCR untersucht.

Abstriche sollten vor der Operation zirkulierend entlang des kompletten unterminierten Randes der Ulzera entnommen werden. Biopsien sollten nach der Operation „benachbart zueinander“ am Exzisionsmaterial entnommen werden, das gesamte subkutane Fettgewebe enthalten und eine maximale Oberflächenabmessung von 10 x 10 mm aufweisen.

Die Probenentnahmestelle der Biopsien bei ulzerativen Läsionen sollte sich am Ende des unterminierten Ulkusrandes an der Grenze zwischen nekrotischem und ulzerativem Gewebe befinden (siehe Abb. 5). Noduläre Läsionen sollten an der erhöhten Stelle horizontal und vertikal in vier gleich große Stücke geteilt werden, die alle zu gleichen Teilen das Läsionszentrum enthalten sollten. Bei Plaques und Papeln sollten die Proben auf gleiche Weise vom Läsionszentrum entnommen werden.

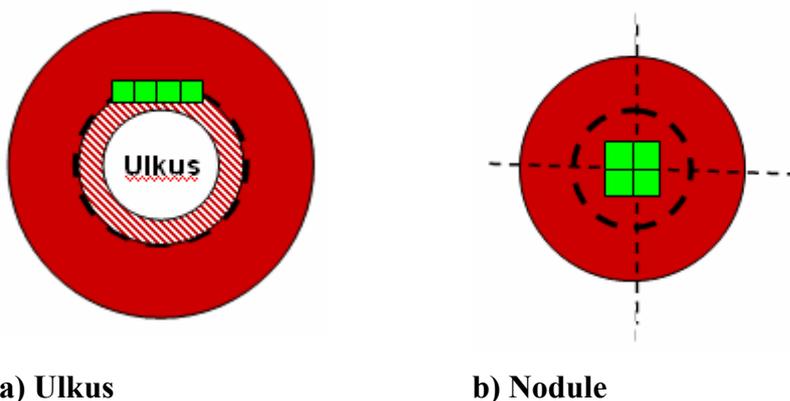


Abb. 5. Probenabnahmetechnik bei Ulkus und Nodule.

- a) **Ulkus**: Das exzidierte Gewebe ist rot, der unterminierte Ulkusrand rot-weiß schraffiert dargestellt. In der Mitte der Abbildung ist das eigentliche Ulkus skizziert. Die Probenabnahместelle ist grün dargestellt.
- b) **Nodule**: das exzidierte Gewebe ist rot dargestellt, die erhabene Stelle in der Mitte des Nodules ist dickgestrichelt skizziert. Die Schnittführung bei der Probenentnahme ist dünngestrichelt, die Probenabnahместelle grün dargestellt.

3.2.2.4 Aufbewahrung der Proben

Biopsien und Abstrichtupfer für Mikroskopie und Kultur sollten nach der Probenentnahme in Mykobakterien-Transportmedium (3.1.5.1.1) gelagert, Biopsien und Abstrichtupfer für die DRB-PCR sowie für die Standard-PCR im DNA-Extraktionspuffer CLS (3.2.1.2), und Biopsien für histopathologische Untersuchungen in 10 % Formalin (3.1.5.1.6) aufbewahrt werden. Alle zur Aufbewahrung der Proben benötigten Medien und Gefäße wurden den beteiligten Krankenhäusern in Form von „Probenabnahme-Sets“ zur Verfügung gestellt. Die Sets enthielten neben den sterilen Abstrichtupfern und den das jeweilige Transportmedium enthaltenden Probengefäße auch eine sterile Pinzette, ein Einmal-Skalpell sowie ein Formular zur Datenerfassung (3.2.2.6).

3.2.2.5 Datenerfassung

Zur Datenerfassung wurde ein Formular (Abb. 12) entwickelt, das während der Probensammlung vom Krankenhauspersonal ausgefüllt wurde. Zur Datenerfassung wurde das allen Krankenhäusern von dem ghanaischen Gesundheitssystem zur Erhebung klinischer, therapeutischer und epidemiologischer Daten zur Verfügung gestellte sog. „BU1“-Formular (Abb. 11) herangezogen.

3.2.2.6 Datendokumentation

Alle erhobenen Daten und Testergebnisse wurden anhand von Datenauswertungstabellen dokumentiert. Die Formulare sollten dem Datenaustausch zwischen den in die Studie involvierten Laboren dienen und als Übersicht der Testergebnisse den Behandlungszentren zur Verfügung gestellt werden. Die diagnostischen Endbefunde sollten so dem ghanaischen Gesundheitssystem für statistische Zwecke zur Verfügung gestellt werden.

3.2.2.7 Labormethoden zur Diagnose des Buruli-Ulkus

3.2.2.7.1 Mikroskopie

Der Nachweis von AFB im Patientenmaterial war durch Mikroskopie von Abstrichen und Biopsien möglich. Das KCCR fungierte als lokales Referenzlabor, das BNI / AITM als externes Referenzlabor.

3.2.2.7.1.1 Ziehl-Neelsen-Färbung von AFB

Ein Tropfen der nach der Dekontamination erhaltenen Bakteriensuspension wurde auf einen Objektträger aufgebracht und vollständig luftgetrocknet. Zur Fixierung der Bakterien wurde der Objektträger danach dreimalig kurz über die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen.

Anschließend wurde der Objektträger mit Karbolfuchsinlösung bedeckt und die Unterseite des Objektträgers vorsichtig bei kleiner Flamme erhitzt. Die Karbolfuchsinlösung durfte dabei keinesfalls kochen. Danach wurde der Objektträger 5 Minuten bei RT belassen, mit Wasser abgespült und mit 20 % Schwefelsäure-Lösung vollständig bedeckt. Nach 5 Minuten wurde der Objektträger erneut mit Wasser gespült, danach 1 Minute mit Methylenblau-Lösung bedeckt und wiederum mit Wasser abgespült. Nach dem Trocknen bei RT konnten die Objektträger mikroskopisch untersucht werden.

3.2.2.7.1.2 Bewertung des Mikroskopie-Ergebnisses

Zur Bewertung der gemäß 3.2.2.7.1.1 gefärbten Objektträger wurden im Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung 100 Gesichtsfelder hinsichtlich AFB untersucht. Wurden weniger als 10 AFB / 100 Gesichtsfelder gefunden, wurde die exakte Anzahl dokumentiert, wurden mehr als 10 AFB nachgewiesen, wurde das Ergebnis „+“ (positiv für AFB) gewertet. Nachgewiesene AFB stellten einen Mykobakterium-Gattungsnachweis dar.

3.2.2.7.2 Kultur

Kulturen von *Mycobacterium ulcerans* aus Patientenmaterial wurden aus Abstrichen und Biopsien angelegt.

3.2.2.7.2.1 Dekontamination und Inokulation (87)

Das im Transportmedium gelagerte Patientenmaterial wurde steril unter der Sicherheitswerkbank verarbeitet. Transportmedium und Abstrichtupfer wurden in ein 50 ml Falcongefäß überführt. Biopsien wurden zuvor unter Verwendung eines Mörsers und 0,5 ml 0,9 % NaCl zerkleinert, bevor das Material zum schon dekantierten Transportmedium gegossen wurde. Es wurde 4 % NaOH (v / v) zugesetzt und 15 Minuten im Laborschüttler leicht geschüttelt. Anschließend wurde zentrifugiert (15 Minuten, 3000g), der Überstand verworfen, 15 ml 0,9 % NaCl zugesetzt und erneut zentrifugiert (15 Minuten, 3000 g). Der Überstand wurde verworfen, die Bakterien-Pellets mit 0,5 ml 0,9 % NaCl resuspendiert und 0,5 ml der Suspension zur Kultivierung auf Löwenstein-Jensen-Medien pipettiert.

3.2.2.7.2.2 Bewertung der Kulturergebnisse

Die inokulierten Medien wurden bei 32 °C inkubiert und sechs Monate wöchentlich hinsichtlich mykobakteriellen Wachstums überprüft. Wurde innerhalb dieser Zeit kein Wachstum festgestellt, wurden die Kulturen weitere sechs Monate bei RT bebrütet und ein Mal monatlich hinsichtlich Wachstums überprüft. Wenn nach 12 Monaten kein Wachstum nachgewiesen werden konnte, wurden die Kulturen verworfen. Bei festgestelltem Wachstum

wurde die Kultur als „bewachsen („G“ = Engl.: „*growth*““ eingestuft. Es wurde eine Ziehl-Neelsen-Färbung des Kulturmaterials vorgenommen (3.2.2.7.1.1), um das Vorhandensein von AFB zu überprüfen und eine Kontamination auszuschließen. Dazu wurde ein Wassertropfen auf einen Objektträger aufgebracht und eine Kolonie der bewachsenen Kultur darin verteilt. Wurden AFB gefunden, galt das Wachstum der entsprechenden Kultur fortan als „bestätigt“ („G“ + „AFB“). Nachgewiesene AFB stellten einen Mykobakterium-Gattungsnachweis dar.

3.2.2.7.3 PCR

Abstriche und Biopsien wurden durch Standard-PCR (72) und DRB-PCR untersucht. Das KCCR fungierte als lokales Referenzlabor, das BNI / AITM als externes Referenzlabor.

3.2.2.7.3.1 Bewertung der PCR-Ergebnisse

Eine PCR konnte als negativ, positiv oder inhibiert gewertet werden (3.2.1.8.2). Nachgewiesene Amplifikate stellten einen *Mycobacterium ulcerans*-Speziesnachweis dar.

3.2.2.7.4 Histopathologie

Biopsien wurden histopathologisch auf das Vorliegen einer *Mycobacterium ulcerans*-Infektion untersucht. Alle histopathologischen Untersuchungen wurden von Prof. Paul Racz und Mitarbeitern, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg, durchgeführt.

3.2.2.7.4.1 Bewertung der Histopathologie-Ergebnisse (30)

Die histopathologische Diagnose wurde anhand des Nachweises säurefester Stäbchen (Engl.: *acid fast bacilli*, AFB) im subkutanen Fettgewebe und / oder dem Vorliegen Buruli-Ulkus charakteristischer Gewebsveränderungen gestellt. Dabei wurde eine Klassifizierung in drei Gruppen vorgenommen:

- 1: Eine definitive Buruli-Ulkus-Diagnose (Engl.: „*definite BU*“) konnte gestellt werden. Zusätzlich wurde ausgehend von der Anzahl der gefundenen AFB eine Eingruppierung in „wenige AFB“ (Engl.: „*AFB mild*“, 1 bis 5 AFB in 100 Gesichtsfeldern, 40 x Objektiv), gemäßigt viele AFB (Engl.: „*AFB moderate*“, mehr als 6 AFB in 100 Gesichtsfeldern, 40 x Objektiv) und „zahlreiche AFB“ (Engl.: „*AFB marked*“, zahlreiche AFB bei 20 x Objektiv) vorgenommen.
- 2: Waren keine AFB (Engl.: „*no AFB*“) und keine Buruli-Ulkus-charakteristischen Gewebsveränderungen nachweisbar, sollten die Proben als „Verdachtsfall“ behandelt werden, bis eine andere Diagnose gestellt werden konnte.
- 3: Das Heilungsstadium (47) wurde als dritte Gruppe der Klassifizierung verwendet.

3.2.2.8 Ermittlung der diagnostische Endbefunde (Konsensus-Ergebnisse) von Mikroskopie und PCR

Die Proben wurden zunächst getrennt voneinander durch das lokale und das externe Referenzlabor untersucht. Übereinstimmende Ergebnisse wurden als „Konsensus-Ergebnis“ gewertet, abweichende Proben wurden erneut durch beide Labore getestet. Diese insgesamt vier Ergebnisse wurden verglichen. Das Ergebnis, das nach der Wiederholung insgesamt drei Mal erhalten wurde, wurde ebenfalls als Konsensus-Ergebnis gewertet. Konsensus-Ergebnisse wurden den Behandlungszentren als „diagnostische Endbefunde“ mitgeteilt. Abweichende Ergebnisse zwischen lokalem und externem Referenzlabor bei Proben, die bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse nur zwei Mal das gleiche Ergebnis erbrachten, wurden als nicht auswertbar (Engl.: „*not determined*“) gewertet.

3.2.2.9 Ermittlung der diagnostischen Sensitivität

Im Rahmen dieser Studie beschreibt die diagnostische Sensitivität den Anteil der positiven Ergebnisse unter Verwendung einer bestimmten Testmethode, gemessen am Gesamtkollektiv aller klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle im Studienzeitraum.

Die diagnostische Sensitivität der „Methode Mikroskopie“ wurde anhand der Konsensus-Ergebnisse zwischen lokalem und externen Referenzlabor bestimmt, die diagnostische Sensitivität der „Methode PCR“ wurde unter Verwendung der Konsensus-Ergebnisse zwischen DRB- und Standard-PCR ermittelt, die diagnostischen Sensitivitäten von DRB-PCR und Standard-PCR wurden jeweils anhand der durch die jeweilige PCR-Methode erreichten Anzahl positiver Tests, nach Wiederholung der zunächst zwischen DRB- und Standard-PCR abweichenden Ergebnisse, bestimmt.

3.2.2.10 Interne Qualitätskontrolle

Eine interne Qualitätskontrolle (Positivkontrolle, Negativkontrolle, Extraktionskontrolle, Inhibitionskontrollen) wurde nur bei der PCR, wie in 3.2.2.7.3 beschrieben, durchgeführt.

3.2.2.11 Externe Qualitätskontrolle (Engl.: *external quality assessment, EQA*)

Durch die externe Qualitätskontrolle wurde die Laborleistung, unabhängig von den verschiedenen getesteten Materialien, am zu überprüfenden Labor evaluiert.

Das KCCR fungierte als Test-Labor, das BNI / AITM als supervisierendes Kontroll-Labor.

3.2.2.11.1 Probenanzahl

Das Kollektiv der getesteten Proben bestand aus 120 Abstrichen und 204 Biopsien von 204 klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus-Verdachtsfällen, die durch Mikroskopie, DRB-PCR und Standard-PCR untersucht wurden. Aufgrund fehlender Basis-Daten wurden zur Bestimmung der EQA 100 % aller erhaltenen Proben untersucht.

3.2.2.11.2 Vorgehen

Die Proben wurden zunächst vom Test-Labor untersucht, anschließend „blind“ (im Falle der Mikroskopie) bzw. parallel durch Untersuchung einer eigenen Probe (im Falle der PCR) durch das Kontroll-Labor getestet. Alle Proben, die in dieser 1. Untersuchung zwischen Test- und Kontroll-Labor keine übereinstimmenden Ergebnisse zeigten, wurden erneut durch das Kontroll-Labor untersucht. Das 2. Ergebnis des Kontroll-Labors wurde als Endergebnis gewertet. Zu Trainingszwecken wurden alle nicht übereinstimmenden Proben durch das Test-Labor unter Supervision durch das Kontroll-Labor wiederholt.

3.2.2.12 Statistische Analyse der Daten und bestimmte Parameter (6)

Inter-Assay-Übereinstimmungs- und Abweichungsrate

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Auswertung der PCR-Ergebnisse der Anteil der zwischen Test- und Kontroll-Labor übereinstimmend ermittelten Ergebnisse, gemessen am Gesamtkollektiv aller klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle bestimmt. Dies wurde nur im Falle der PCR durchgeführt, da hier die neu entwickelte DRB-PCR mit der Standard-Methode verglichen wurde. Im Falle der Mikroskopie war dies nicht nötig, da diese eine etablierte Methode darstellt, die von zwei unabhängigen Laboren gleichermaßen und am selben Material durchgeführt wurde.

Falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse

Falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse des Test-Labors wurden im Vergleich zu den Endergebnissen des Kontroll-Labors bestimmt.

Sensitivität

Die Sensitivität beschreibt die Wahrscheinlichkeit eines positiven Testbefundes bei erkrankten Personen. Sie ist ein Maß für den Anteil der Patienten, die durch einen Test erkannt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die positiven Ergebnisse am Gesamtkollektiv aller klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle gemessen.

Spezifität

Die Spezifität beschreibt die Wahrscheinlichkeit eines negativen Testbefundes bei nicht erkrankten Personen. Sie ist ein Maß für den Anteil der nicht erkrankten Personen mit

negativem Testbefund. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die negativen Ergebnisse am Gesamtkollektiv aller klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle gemessen.

Prädikativwerte (positiver Prädikativwert, negativer Prädikativwert)

Der positive Prädikativwert beschreibt die Wahrscheinlichkeit der tatsächlichen Erkrankung einer Person mit positivem Testbefund. Der negative Prädikativwert gibt die Wahrscheinlichkeit der tatsächlichen Nichterkrankung einer Person mit negativem Testbefund wieder. Die Bestimmung der Prädikativwerte wurde unter Verwendung des Programms EpiInfo 3.3.2. durchgeführt.

Likelihood Ratio (LR, positive LR, negative LR)

Die Likelihood Ratio gibt an, wie viele Male häufiger ein positives Testergebnis bei tatsächlich erkrankten Personen erreicht wird, im Vergleich zu tatsächlich nicht erkrankten Personen. Eine „gute“ positive LR für positive Testergebnisse liegt über dem Wert 1, eine „gute“ negative LR für negative Testergebnisse liegt unter dem Wert 0,1.

Odds ratio (OR)

Die Odds Ratio beschreibt das Verhältnis zweier Ereignisse („Chancen“ (Engl.: *Odds*“)) in Vierfeldertafeln zueinander in einer Maßzahl zwischen 0 und 1. Anhand der Odds Ratio wird das Maß für die Stärke des Unterschiedes zwischen zwei Anteilswerten ausgedrückt und kann als Zusammenhangsmaß aufgefasst werden. Ob das OR-Ergebnis signifikant ist, sagt der KI (95 %-Konfidenzintervall). Ist dieser > 1 ist, ist der OR signifikant. Die Bestimmung der Odds Ratio wurde unter Verwendung des Programms EpiInfo 3.3.2. durchgeführt.

p-Wert (Statistische Signifikanz)

Die statistische Signifikanz (p-Wert) sagt aus, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass ein gemessener Unterschied zufällig ist. $P < 0.05$ bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit kleiner als 5 % ist. Die statistische Signifikanz ist von der Größe der untersuchten Population abhängig.

Die Bestimmung des p-Wertes wurde unter Verwendung des Programms EpiInfo 3.3.2. durchgeführt.

κ -Koeffizient (nach Cohen)

Der κ -Koeffizient bestimmt die Übereinstimmung zwischen zwei Methoden oder Tests in einer Maßzahl zwischen 0 und 1. Ab einem Wert $< 0,1$ gelten beide Ergebnisse als konkordant, ein Wert $> 0,1$ zeigt, dass die Ergebnisse als Zufall zu werten sind. Die Bestimmung des κ -Koeffizienten (nach Cohen) wurde unter Verwendung des Programms EpiInfo 3.3.2. durchgeführt.

Untersuchung der Ausbreitung von *M. ulcerans* in die angrenzende Umgebung des Geschwürs

3.2.2.13 Studienaufbau

Die Studie sollte unter Berücksichtigung der Einschlusskriterien (3.2.2.14) 20 durch PCR und Histopathologie laborbestätigte Buruli-Ulkus-Patienten umfassen.

Durch die Untersuchung der „Gradienten“-Sets anhand von PCR, Histopathologie und Kultur sollte die Progression der Infektion vom Zentrum der Läsion in die Peripherie bis zur Exzisionslinie untersucht werden. Anhand der „Exzisionsrand“-Sets sollte mittels PCR untersucht werden, ob alle Exzisionsrandstellen tatsächlich frei von Bakterien waren.

3.2.2.14 Einschlusskriterien

Eingeschlossen werden konnten sowohl prä-ulzerative als auch ulzerative Läsionstypen. Die Dauer der Erkrankung sollte sechs Monate nicht übersteigen, der Durchmesser der Läsion sollte maximal 10 cm betragen.

3.2.2.15 Probenabnahmetechnik „Gradientensets“

Das Exzisionsgewebe wurde an einer repräsentativen Stelle in drei parallele Gewebsektionen (max. 50 x 15 mm) von der Peripherie zum Zentrum der Läsion geschnitten. Je eine der Sektionen wurde durch PCR, Kultur und Histopathologie untersucht. Dazu wurden die Sektionen in Segmente (10 x 5 mm) geschnitten. Das zentrale Segment wurde mit dem Buchstaben „a“ gekennzeichnet, die Nummerierung setzte sich entsprechend in die Peripherie fort. Abhängig von der Größe der Läsion variierte die Anzahl der pro Set untersuchten Segmente von drei bis sechs (vgl. Tabelle 34). Abb. 6a) verdeutlicht die Probenabnahmetechnik. Aufgrund der langen Generationszeit der Kultur konnten die Kulturergebnisse in die Auswertung dieser Studie nicht miteinbezogen werden.

3.2.2.16 Probenabnahmetechnik „Exzisionsrandsets“

Bei kleineren Läsionen wurde der komplette Exzisionsrand, bei ausgedehnten Läsionen wurden Teile des Exzisionsrandes in Segmente von 10 x 5 cm Größe geschnitten. Aus anatomischen Gründen war es nicht möglich, drei parallele Sektionen für drei Labortests zu entnehmen, daher wurden die Proben ausschließlich durch PCR untersucht. Abb. 6b) verdeutlicht die Probenabnahme der Exzisionsrandproben.



a)

b)

Abb. 6. Probenabnahme der a) „Gradientensets“ und b) „Exzisionsrandsets“.

a) „Gradientenprobensets“ bestanden aus drei parallelen Gewebsektionen, von denen je eine Sektion durch PCR, Kultur und Histopathologie untersucht wurde. Die Sektionen wurden in Segmente identischer Größe unterteilt und das zentrale Segment mit dem Buchstaben „a“ gekennzeichnet. Die Nummerierung setzte sich entsprechend in die Peripherie fort.

b) Zur Gewinnung der „Exzisionsrandsets“ wurde abhängig von der Größe der Exzision entweder der gesamte Exzisionsrand oder nur Teile des Exzisionsrandes in gleich große Segmente unterteilt.

3.2.2.17 Bewertung der Ergebnisse

Die Befundung der PCR-Ergebnisse erfolgte in Analogie zu 3.2.2.7.3.1. Inhibierte Reaktionen wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die histopathologische Beurteilung erfolgte analog zu 3.2.2.7.4.1.

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung und Validierung einer an tropische Bedingungen adaptierten PCR zum Nachweis von *M. ulcerans*

4.1.1 Präparation eines quantifizierten Plasmid-DNA-Standards

Ein Genom-Äquivalent des gemäß 3.2.1.5 präparierten und quantifizierten Plasmids entsprach 50 Plasmidkopien.

4.1.2 Entwicklung der DRB-PCR

Die Entwicklung der DRB-PCR erfolgte wie geplant und in 3.2.1 beschrieben im Rahmen von Validierungsphase I und Validierungsphase II.

4.1.2.1 Validierungsphase I der DRB-PCR

Es wurden 19 Abstriche und 16 Biopsien von 16 Patienten mit klinischer Verdachtsdiagnose Buruli-Ulkus durch DRB-PCR und Standard-PCR untersucht.

4.1.2.1.1 Allgemeine Spezifitätsüberprüfung

Unter Verwendung beider PCR-Methoden wurde kein Nachweis von 15 verwandten Mykobakterien (Tabelle 33) erzielt. Ebenfalls erfolgte kein Nachweis bei der Amplifikation diverser Hautkeime (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* und *Micrococcus spp.*). Die Spezifität betrug 100 %.

4.1.2.1.2 Allgemeine Sensitivitätsüberprüfung

Die Untersuchung von 39 Extrakten aus *M. ulcerans*-Kulturmaterial (Tabelle 33) durch DRB-PCR und Standard-PCR zeigte unter Verwendung beider PCR-Methoden bei allen getesteten Extrakten positive Ergebnisse für beide PCR-Methoden. Die Sensitivität betrug 100 %.

4.1.2.1.3 Analytische Sensitivität beider Methoden

Die Amplifikation einer Endpunktverdünnungsreihe des Plasmids pMU jeweils durch DRB-PCR und Standard-PCR ergab bei beiden PCR-Methoden eine Nachweisgrenze von 1,5 Genomäquivalenten in 100 % der Tests. Arithmetisch höhere Verdünnungen (~ 0,15 Genom-Äquivalente und weniger) wurden mit beiden Methoden nur vereinzelt nachgewiesen.

4.1.2.1.4 *Inter-Assay*-Übereinstimmungsrate

Die Untersuchung von 19 Abstrichen ergab eine *Inter-Assay*-Übereinstimmungsrate zwischen beiden PCR-Methoden von 94,7 %, nur bei einem Abstrich wurde zwischen DRB- und Standard-PCR ein abweichendes Ergebnis ermittelt. Bei der Untersuchung von 16 Biopsien wurde eine *Inter-Assay*-Übereinstimmungsrate von 75 % zwischen beiden PCR-Methoden festgestellt, vier Biopsien zeigten abweichende Ergebnisse. Tabelle 1 und Tabelle 2 verdeutlichen die Ergebnisse.

Abstriche (n = 19)	DRB-PCR	Standard-PCR	Anzahl	<i>Inter-Assay</i> -Übereinstimm.
	pos	pos	31,6 % (6 / 19)	94,7 % (18 / 19)
	neg	neg	63,2 % (12 / 19)	
	DRB-PCR	Standard-PCR	Anzahl	Abweichung
	neg	pos	5,3 % (1 / 19)	5,3 %
pos	neg	0 % (0 / 19)	(1 / 19)	

Tabelle 1 Validierungsphase I der DRB-PCR, *Inter-Assay*-Übereinstimmung, Abstriche

Inter-Assay-Übereinstimm: *Inter-Assay*-Übereinstimmungsrate; neg: negativ; pos: positiv

Biopsien (n = 16)	DRB-PCR	Standard-PCR	Anzahl	<i>Inter-Assay</i> -Übereinstimm.
	pos	pos	18,3 % (3 / 16)	75,0 % (12 / 16)
	neg	neg	56,3 % (9 / 16)	
	DRB-PCR	Standard-PCR	Anzahl	Abweichung
	neg	pos	6,3 % (1 / 16)	25,0 %
pos	neg	18,8 % (3 / 16)	(4 / 16)	

Tabelle 2 Validierungsphase I der DRB-PCR, *Inter-Assay*-Übereinstimmung, Biopsien

Inter-Assay-Übereinstimm: *Inter-Assay*-Übereinstimmungsrate; neg: negativ; pos: positiv

Die differentialdiagnostischen Ergebnisse von 9 unter Verwendung beider PCR-Methoden negativ getesteten Biopsien (eingerahmt) sind in 0 gezeigt.

4.1.2.1.5 Diagnostische Sensitivität

Die Untersuchung von 19 Abstrichen und 16 Biopsien bei 19 Patienten mit klinischer Verdachtsdiagnose Buruli-Ulkus durch DRB-PCR ergab eine diagnostische Sensitivität von 31,6 % für Abstriche und 37,5 % für Biopsien. Die diagnostische Sensitivität der Standard-PCR, ebenfalls bezogen auf alle 19 Patienten mit klinischer Verdachtsdiagnose Buruli-Ulkus, wurde bei der Untersuchung der identischen Proben mit 36,8 % für die Abstriche und mit 25,0 % für Biopsien ermittelt. Tabelle 3 und Tabelle 4 verdeutlichen die Ergebnisse.

Abstriche (n = 19)	Ergebnis	Anzahl	Prozent [%]
DRB-PCR	pos	6	31,6
	neg	13	68,4
Standard-PCR	pos	7	36,8
	neg	12	63,2

Tabelle 3 Validierungsphase I der DRB-PCR, Diagnostische Sensitivität, Abstriche

neg: negativ; pos: positiv

Biopsien (n = 16)	Ergebnis	Anzahl	Prozent [%]
DRB-PCR	pos	6	37,5
	neg	10	62,5
Standard-PCR	pos	4	25,0
	neg	12	75,0

Tabelle 4 Validierungsphase I der DRB-PCR, Diagnostische Sensitivität, Biopsien

neg: negativ; pos: positiv

4.1.2.2 Validierungsphase II der DRB-PCR: Pilotstudie unter tropischen Bedingungen

22 Abstriche und 30 Biopsien von 30 klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus-Patienten wurden durch DRB-PCR unter tropischen Bedingungen und durch Standard-PCR unter Standard-Bedingungen untersucht.

4.1.2.2.1 Inter-Assay-Übereinstimmungsrate

Die *Inter-Assay*-Übereinstimmungsrate zwischen DRB-PCR und Standard-PCR betrug 95,5 % für Abstriche und 96,7 % für Biopsien. Tabelle 5 und Tabelle 6 zeigen die Ergebnisse.

Abstriche (n = 22)	DRB-PCR	Standard-PCR	Auswertung	<i>Inter-Assay-Übereinstimm.</i>
	pos	pos	27,3 % (6 / 22)	95,5 % (21 / 22)
	neg	neg	68,2 % (15 / 22)	
	DRB-PCR	Standard-PCR	Auswertung	Abweichung
	neg	pos	4,5 % (1 / 22)	4,5 %
pos	neg	0 % (0 / 22)	(1 / 22)	

Tabelle 5 Validierungsphase II der DRB-PCR, *Inter-Assay*-Übereinstimmungsrate, Abstriche*Inter-Assay-Übereinstimm.*: *Inter-Assay*-Übereinstimmungsrate; neg: negativ; pos: positiv

Biopsien (n = 30)	DRB-PCR	Standard-PCR	Auswertung	<i>Inter-Assay-Übereinstimm.</i>
	pos	pos	36,7 % (11 / 30)	96,7 % (29 / 30)
	neg	neg	60,0 % (18 / 30)	
	DRB-PCR	Standard-PCR	Auswertung	Abweichung
	neg	pos	3,3 % (1 / 30)	3,3 %
pos	neg	0 % (0 / 30)	(1 / 30)	

Tabelle 6 Validierungsphase II der DRB-PCR, *Inter-Assay*-Übereinstimmungsrate, Biopsien*Inter-Assay-Übereinstimm.*: *Inter-Assay*-Übereinstimmungsrate; neg: negativ; pos: positiv

Die differentialdiagnostischen Ergebnisse von 18 unter Verwendung beider PCR-Methoden negativ getesteten Biopsien (eingerahmt) sind in 0 gezeigt.

4.1.2.3 Diagnostische Sensitivität beider Methoden

Bei der Untersuchung aller klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle wurden diagnostische Sensitivitäten von 27,2 % für Abstriche und 36,7 % für Biopsien ermittelt. Die parallele Untersuchung eines zweiten Probensets durch die Standard-PCR ergab diagnostische Sensitivitäten, bezogen auf die Gesamtanzahl aller untersuchten klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle, von 31,8 % für Abstriche und von 40,0 % für Biopsien. Tabelle 7 und Tabelle 8 verdeutlichen die Ergebnisse.

Abstriche (n = 22)	Ergebnis	Anzahl	Prozent [%]
DRB-PCR	pos	6	27,2
	neg	16	72,7
Standard-PCR	pos	7	31,8
	neg	15	68,2

Tabelle 7 Validierungsphase II der DRB-PCR, Diagnostische Sensitivität, Abstriche

neg: negativ; pos: positiv

Biopsien (n = 30)	Ergebnis	Anzahl	Prozent [%]
DRB-PCR	pos	11	36,7
	neg	19	63,3
Standard-PCR	pos	12	40,0
	neg	18	60,0

Tabelle 8 Validierungsphase II der DRB-PCR, Diagnostische Sensitivität, Biopsien

neg: negativ; pos: positiv

4.1.3 Differentialdiagnostische Untersuchung der in beiden PCR-Methoden negativ getesteten Proben

Die histopathologische Untersuchung von 9 Biopsien aus Validierungsphase I und 18 Biopsien aus Validierungsphase II, die durch beide PCR-Methoden negativ getestet wurden, zeigte folgende Ergebnisse: elf Biopsien erwiesen sich als ungeeignet für eine histopathologische Untersuchung, da das subkutane Fettgewebe ganz oder teilweise fehlte. Bei zwei Biopsien war eine eindeutige histopathologische Beurteilung nicht möglich.

In sechs Fällen konnten folgende Differentialdiagnosen gestellt werden: Bei zwei Proben lag eine unspezifische Dermatitis vor, eine Probe wurde als Kaposi Sarkom, eine andere als kutane Tuberkulose diagnostiziert. Es wurden zwei parasitäre Infektion festgestellt, in einem Fall davon Onchozerkose. In acht Fällen wurde trotz negativer PCR eine Buruli-Ulkus-Infektion gefunden, wobei in einem Fall die inaktive Heilungsphase des Buruli-Ulkus vorlag.

4.2 Vergleichende Studie aller zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden

4.2.1 Vorarbeiten

Durch 200 *village health worker*, die zu Studienbeginn im Erkennen von Buruli Ulkus-Patienten geschult worden waren, wurde die konstante Patientenrekrutierung im Studienzeitraum erreicht.

Der Einfluss der Probennahme und –lagerung auf die Testergebnisse wurde durch die Entwicklung von standardisierten Probeentnahmekriterien minimiert. Die definierten Kriterien der Probenentnahme sind im Detail in 3.2.2.3 beschrieben.

4.2.2 Beschreibung des Patientenkollektivs

Es wurden Probensets von 227 Patienten aus vier verschiedenen Behandlungszentren erhalten. 23 Probensets entsprachen nicht den definierten Probeentnahmevorschriften und wurden daher von der Laboranalyse ausgenommen, 324 Proben von 204 Patienten (120 Abstriche, 204 Biopsien) wurden untersucht. Tabelle 9 zeigt die Anzahl der pro Behandlungszentrum erhaltenen und ausgewerteten Probensets.

Behandlungszentrum	Anzahl Patienten			Anzahl Proben eingeschlossen		
	gesamt	nicht eingeschlossen	eingeschlossen	Abstriche	Biopsien	gesamt
Dunkwa	71	11	60	36	60	96
Agogo	107	1	106	63	106	169
Goaso	40	11	29	15	29	44
Agroyesum	9	0	9	6	9	15
Gesamtanzahl	227	23	204	120	204	324

Tabelle 9 Vergleichsstudie, Patientenkollektiv, Gesamtanzahl erhaltener und ausgewerteter Proben

84 Patienten (41,1 %) mit prä-ulzerativen und 120 Patienten (58,8 %) mit ulzerativen Läsionen wurden untersucht. Die Verteilung der pro Behandlungszentrum erhaltenen Läsionstypen zeigt Tabelle 10, Abb. 7 stellt die Verteilung graphisch dar.

BZ	Anzahl Patienten gesamt	prä-ulzerative Läsionen			ulzerative Läsionen		
		Anzahl	Anteil am BZK [%]	Anteil am GK [%]	Anzahl	Anteil am BZK [%]	Anteil am GK [%]
Dunkwa	60	24	40	28,6	36	60	17,6
Agogo	106	43	40,6	51,1	63	59,4	30,9
Goaso	29	14	48,3	16,7	15	51,7	7,4
Agroyesum	9	3	33,3	3,6	6	66,7	2,9
Gesamtanz	204	84		41,1	120		58,8

Tabelle 10 Vergleichsstudie, Patientenkollektiv, Verteilung Läsionstyp in Behandlungszentren

BZ: Behandlungszentrum; **Gesamtanz:** Gesamtanzahl; **GK:** Gesamtkollektiv; **BZK:** Patientenkollektiv des Behandlungszentrums

In allen Behandlungszentren wurden anteilig mehr ulzerative als prä-ulzerative Läsionen gefunden. Die prozentuale Verteilung der Läsionen in den verschiedenen Behandlungszentren lag zwischen 33,3 % und 48,3 % für prä-ulzerative, und zwischen 51,7 % und 66,7 % bei ulzerativen Läsionen.

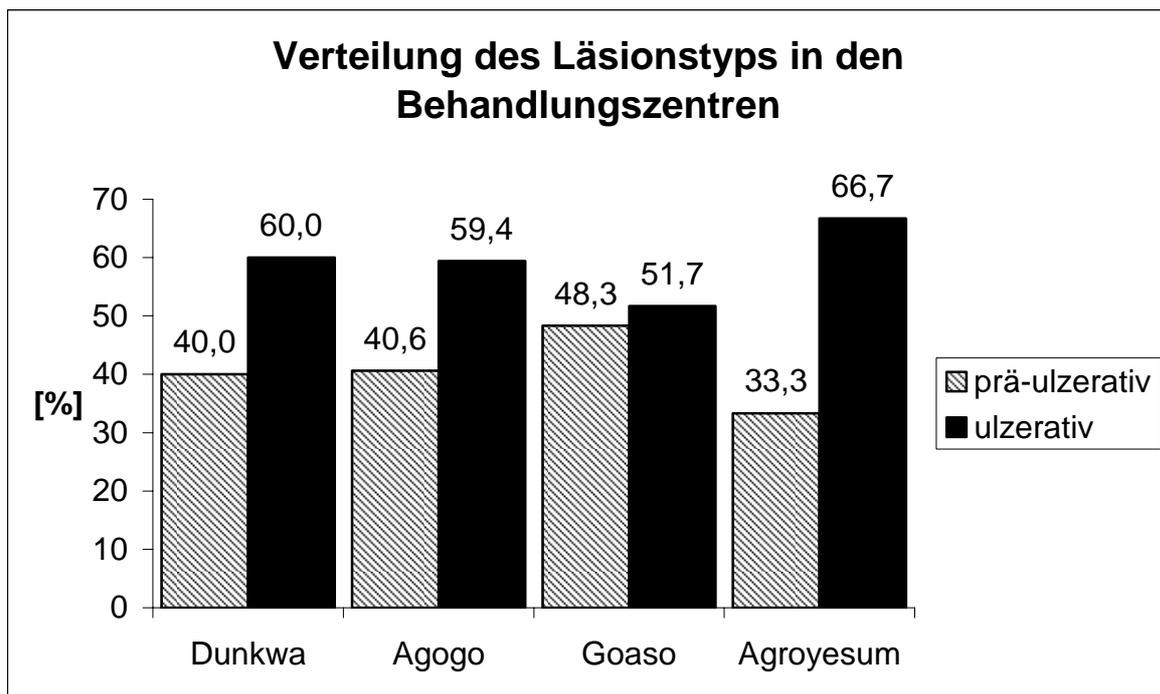


Abb. 7. Vergleichsstudie, Patientenkollektiv, Verteilung Läsionstyp in Behandlungszentren

4.2.3 Vergleich der diagnostischen Methoden

Die Ergebnisse aller derzeit zur Verfügung stehenden Labormethoden zur Diagnose der Buruli-Ulkus-Erkrankung sind gemäß 3.2.2 einzeln und vergleichend dargestellt.

4.2.3.1 Mikroskopie

4.2.3.1.1 Konsensus-Ergebnisse (diagnostische Endbefunde)

4.2.3.1.1.1 Abstriche

33,3 % der Abstriche wurden zwischen lokalem und externem Referenzlabor übereinstimmend positiv, 66,7 % der Abstriche übereinstimmend negativ gefunden, d. h. es konnten bei 100 % der Proben Konsensus-Ergebnisse als diagnostische Endbefunde ermittelt werden. Tabelle 11 verdeutlicht die Ergebnisse der Abstriche, gegliedert nach den Behandlungszentren und insgesamt im Überblick.

Abstriche	gesamt		Dunkwa		Agogo		Goaso		Agroyesum	
	Anz.	[%]	Anz.	[%]	Anz.	[%]	Anz.	[%]	Anz.	[%]
Konsensus-Ergebnisse										
pos	40	33,3	10	27,8	25	39,7	3	20	2	33,3
neg	80	66,7	26	72,2	38	60,3	12	80	4	66,7
Kons. gesamt	120	100	36	100	63	100	15	100	6	100
Abweichende Ergebnisse										
Abweich. gesamt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gesamtanzahl Proben	120	100	36	100	63	100	15	100	6	100

Tabelle 11 Vergleichsstudie, Konsensus-Ergebnisse, Abstriche

Abweich.: Abweichende Ergebnisse; Anz.: Anzahl; Kons.: Konsensus-Ergebnisse; neg: negativ; pos: positiv

4.2.3.1.1.2 Biopsien

39,7 % der Biopsien wurden zwischen lokalem und externem Referenzlabor übereinstimmend positiv, 57,8 % der Biopsien übereinstimmend negativ gefunden, d.h. es konnten bei 97,5 % der Proben Konsensus-Ergebnisse als diagnostische Endbefunde ermittelt werden, es wurden 2,5 % abweichende Ergebnisse ermittelt. Tabelle 12 verdeutlicht die Ergebnisse der Biopsien, gegliedert nach den Behandlungszentren und insgesamt im Überblick.

Biopsien	gesamt		Dunkwa		Agogo		Goaso		Agroyesum	
	Anz.	[%]	Anz.	[%]	Anz.	[%]	Anz.	[%]	Anz.	[%]
Konsensus-Ergebnisse										
pos	81	39,7	16	26,7	56	52,8	6	20,7	3	33,3
neg	118	57,8	42	70	48	45,3	22	75,9	6	66,7
Kons. gesamt	199	97,5	58	96,7	104	98,1	28	96,6	9	100
Abweichende Ergebnisse										
Abweich. gesamt	5	2,5	2	3,3	2	1,9	1	3,4	0	0
Gesamtanzahl Proben	204	100	60	29,4	106	52,0	29	14,2	9	4,4

Tabelle 12 Vergleichsstudie, Konsensus-Ergebnisse, Biopsien

Abweich.: Abweichende Ergebnisse; Anz.: Anzahl; Kons.: Konsensus-Ergebnisse; neg: negativ; pos: positiv

4.2.3.1.2 Diagnostische Sensitivität der Methode Mikroskopie

Anhand der positiven Konsensus-Ergebnisse, bezogen auf das Gesamtkollektiv aller klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle, errechnete sich eine diagnostische Sensitivität der Abstriche von 33,3 % (40 von 120 Proben), die diagnostische Sensitivität der Biopsien, bezogen auf alle klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus Verdachtsfälle, betrug 39,7 % (81 von 204 Proben).

4.2.3.2 Kultur

0 % der aus Abstrichen angelegten Kulturen zeigten mykobakterielles Wachstum, bei 92,5 % der Kulturen wurde kein Wachstum festgestellt, 7,5 % der Kulturen waren kontaminiert. 3,9 % der aus Biopsien angelegten Kulturen zeigten mykobakterielles Wachstum, bei 89,2 % der Kulturen wurde kein Wachstum festgestellt, 6,9 % der Kulturen waren kontaminiert. Tabelle 13 und Tabelle 14 zeigen die nach Behandlungszentrum gegliederten Ergebnisse im Überblick.

Abstriche	G AFB		NG		C	
	Anz.	[%]	Anz.	[%]	Anz.	[%]
Dunkwa	0	0	33	29,7	3	2,5
Agogo	0	0	57	51,4	6	5
Goaso	0	0	15	13,5	0	0
Agroyesum	0	0	6	5,4	0	0
Gesamtanzahl Proben	0	0	111	92,5	9	7,5

Tabelle 13 Vergleichsstudie, Kulturergebnisse, Abstriche

Anz.: Anzahl; C: contaminated; G AFB: growth + AFB = bestätigtes Wachstum; NG: No growth

Biopsien	G AFB		NG		C	
	Anz.	[%]	Anz.	[%]	Anz.	[%]
Dunkwa	2	1	53	29,1	5	2,5
Agogo	6	2,9	92	50,5	8	3,9
Goaso	0	0	28	15,4	1	0,5
Agroyesum	0	0	9	4,9	0	0
Gesamtanzahl Proben	8	3,9	182	89,2	14	6,9

Tabelle 14 Vergleichsstudie, Kulturergebnisse, Biopsien

Anz.: Anzahl; C: contaminated; G AFB: growth + AFB = bestätigtes Wachstum; NG: No growth

4.2.3.3 PCR

4.2.3.3.1 Inter-Assay-Übereinstimmungsrate, 1. Untersuchung

4.2.3.3.1.1 Abstriche

55,0 % der mittels DRB-PCR und Standard-PCR getesteten Abstriche wurden mit beiden Methoden übereinstimmend positiv gefunden, 20,8 % der Proben wurden übereinstimmend negativ getestet. Die *Inter-Assay*-Übereinstimmungsrate betrug 75,8 % (91 von 120 Proben), die Abweichungsrate betrug 24,2 % (29 von 120 Proben). Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse beider PCR-Methoden sowie die *Inter-Assay*-Übereinstimmungs- und Abweichungsrate, gegliedert nach Behandlungszentren und gesamt im Überblick.

Abstriche		Ergebnisse DRB-PCR, Standard-PCR, 1. Untersuchung									
DRB-PCR	Standard-PCR	gesamt		Dunkwa		Agogo		Goaso		Agroyesum	
		Anz.	[%]	Anz.	[%]	Anz.	[%]	Anz.	[%]	Anz.	[%]
pos	pos	66	55,0	21	58,3	39	61,9	3	20	3	33,3
neg	neg	25	20,8	5	13,9	13	20,6	5	33,3	2	22,2
Übereinstimmungsrate		91	75,8	26	72,2	52	82,5	8	53,3	5	55,6
pos	neg	15	12,5	9	25	5	7,9	0	0	1	11,1
neg	pos	14	11,6	1	2,8	6	9,5	7	46,6	0	0
Abweichungsrate		29	24,2	10	27,8	11	17,4	7	46,6	1	11,1
Gesamtanzahl Proben		120	100	36	30,0	63	52,5	15	12,5	6	5,0

Tabelle 15 Vergleichsstudie, *Inter-Assay*-Übereinstimmungsrate, 1. Untersuchung, Abstriche

Anz.: Anzahl; neg: negativ; pos: positiv

4.2.3.3.1.2 Biopsien

54,9 % der mittels DRB-PCR und Standard-PCR getesteten Biopsien wurden mit beiden Methoden übereinstimmend positiv gefunden, 29,9 % der Proben wurden übereinstimmend negativ getestet. Die *Inter-Assay*-Übereinstimmungsrate betrug durchschnittlich 84,8 % (173 / 204 Proben), die Abweichungsrate betrug 15,2 % (31 / 204 Proben). Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse beider PCR-Methoden sowie die *Inter-Assay*-Übereinstimmungs- und Abweichungsrate, gegliedert nach Behandlungszentren und gesamt im Überblick.

Biopsien Ergebnisse DRB-PCR, Standard-PCR 1. Untersuchung											
DRB-PCR	Standard-PCR	gesamt		Dunkwa		Agogo		Goaso		Agroyesum	
		Anz.	[%]	Anz.	[%]	Anz.	[%]	Anz.	[%]	Anz.	[%]
pos	pos	112	54,9	21	35,0	72	67,9	13	44,8	6	66,7
neg	neg	61	29,9	26	43,3	23	21,7	11	37,9	1	11,1
Übereinstimmungsrate		173	84,8	47	78,3	95	89,6	24	82,8	7	77,8
pos	neg	16	7,8	2	3,3	9	8,5	3	10,3	2	22,2
neg	pos	15	7,3	11	18,3	2	1,9	2	6,9	0	0
Abweichungsrate		31	15,2	13	21,7	11	10,4	5	17,2	2	22,2
Gesamtanzahl Proben		204	100	60	29,4	106	52,0	29	14,2	9	4,4

Tabelle 16 Vergleichsstudie, *Inter-Assay*-Übereinstimmungsrate, 1. Untersuchung, Biopsien

Anz.: Anzahl; neg: negativ; pos: positiv

4.2.3.3.1.3 Diagnostische Sensitivität DRB-PCR und Standard-PCR

Durch die DRB-PCR wurden 81 Abstriche (66 + 15 / 120) positiv getestet, 80 (66 + 14 / 120) Abstriche wurden durch die Standard-PCR positiv gefunden. 128 (112 + 16 / 204) Biopsien wurden durch die DRB-PCR, 127 (112 + 15 / 204) durch die Standard-PCR positiv getestet. Tabelle 17 verdeutlicht die Ergebnisse der diagnostischen Sensitivitäten der beiden PCR-Methoden einzeln, gemessen am Gesamtkollektiv aller klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle.

Diagnostische Sensitivität	Abstriche		Biopsien	
	Anzahl	[%]	Anzahl	[%]
DRB-PCR positiv	81	67,5	128	62,7
Standard PCR positiv	80	66,7	127	62,2

Tabelle 17 Vergleichsstudie, diagnostische Sensitivitäten DRB-PCR und Standard PCR

4.2.3.3.2 Konsensus-Ergebnisse, *Inter-Assay*-Übereinstimmungsrate, 2. Untersuchung

4.2.3.3.2.1 Abstriche

Durch Wiederholung von 29 zwischen DRB- und Standard-PCR diskrepanten Abstrichen konnten 18 weitere übereinstimmende Ergebnisse ermittelt werden, so dass eine *Inter-Assay*-Übereinstimmungsrate von 90,8 % erreicht wurde. 67,0 % der Abstriche wurden übereinstimmend positiv, 33,0 % der Abstriche übereinstimmend negativ gefunden, folglich konnte bei 109 von 120 Abstrichen ein Konsensus-Ergebnis als diagnostischer Endbefund ermittelt werden. Tabelle 18 verdeutlicht die Ergebnisse der Abstriche, gegliedert nach den Behandlungszentren und insgesamt im Überblick.

Abstriche	gesamt		Dunkwa		Agogo		Goaso		Agroyesum	
	Anz.	[%]	Anz.	[%]	Anz.	[%]	Anz.	[%]	Anz.	[%]
Konsensus-Ergebnisse										
positiv	73	67,0	23	65,7	41	65,1	6	40,0	3	50
negativ	36	33,0	12	34,3	17	27,0	5	33,3	2	33,3
Kons. gesamt	109	90,8								
Abweichende Ergebnisse										
Abweich. gesamt	11	9,2	1	2,7	5	7,9	4	26,7	1	16,7
Gesamtanzahl Proben	120	100	36	30	63	52,5	15	100	6	5,0

Tabelle 18 Vergleichstudie, Konsensus-Ergebnisse DRB-PCR und Standard PCR, Abstriche

Abweich. gesamt: Abweichende Ergebnisse gesamt; Anz.: Anzahl; Kons. gesamt: Konsensus-Ergebnisse gesamt

4.2.3.3.2 Biopsien

Durch Wiederholung von 31 zwischen DRB- und Standard-PCR diskrepanten Biopsien konnten 23 weitere übereinstimmende Ergebnisse ermittelt werden, so dass eine *Inter-Assay*-Übereinstimmungsrate von 96,1 % erreicht wurde. 61,2 % der Biopsien wurden übereinstimmend positiv, 38,8 % übereinstimmend negativ gefunden, folglich konnte bei 196 von 204 Biopsien ein Konsensus-Ergebnis als diagnostischer Endbefund ermittelt werden. Tabelle 19 verdeutlicht die Ergebnisse der Biopsien, gegliedert nach den Behandlungszentren und insgesamt im Überblick.

Biopsien	gesamt		Dunkwa		Agogo		Goaso		Agroyesum	
	Anz.	[%]	Anz.	[%]	Anz.	[%]	Anz.	[%]	Anz.	[%]
Konsensus-Ergebnisse										
positiv	120	61,2	25	41,7	74	7,0	14	48,3	7	77,8
negativ	76	38,8	32	56,1	29	27,4	14	48,3	1	11,1
Kons. gesamt	196	96,1								
Abweichende Ergebnisse										
Abweich. gesamt	8	3,9	3	5,0	3	2,8	1	3,4	1	11,1
Gesamtanzahl Proben	204	100	60	29,4	106	52,0	29	14,2	9	4,4

Tabelle 19 Vergleichstudie, Konsensus-Ergebnisse DRB-PCR und Standard PCR, Biopsien

Abweich. Abweichende Ergebnisse; Anz.: Anzahl; Kons: Konsensus-Ergebnisse

4.2.3.3.3 Diagnostische Sensitivität der Methode PCR

Ausgehend von den positiven Konsensus-Ergebnissen, gemessen am Gesamtkollektiv aller klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle, wurde eine diagnostische Sensitivität für die Methode PCR von 60,8 % (73 / 120 Proben) für Abstriche ermittelt, die diagnostische Sensitivität der Biopsien betrug 58,8 % (120 von 204 Proben).

4.2.3.4 Histopathologie

Es wurden 165 Ergebnisse von 204 Biopsien ausgewertet. Von 39 Patienten wurden vor Fertigstellung dieser Arbeit keine histopathologischen Befunde erhalten.

In 101 Patientenproben wurden AFB gefunden. Bei 7 Patienten wurde eine Buruli-Ulkus-Infektion diagnostiziert, ohne dass AFB vorhanden waren, bei 5 Patienten ohne AFB-Nachweis wurde eine Buruli-Ulkus-Infektion vermutet, konnte aber nicht mit Sicherheit bestätigt werden. Die diagnostische Sensitivität, bezogen auf die Anzahl der untersuchten klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle, beträgt 65,5 % (108 von 165 Proben). In 4 Fällen wurde eine Buruli-Ulkus-Infektion ausgeschlossen, eine differentialdiagnostische Angabe wurde nicht erhalten. Bei 34 Biopsien waren keine AFB nachweisbar und ein differentialdiagnostischer Befund konnte nicht gestellt werden. In 17 Fällen wurden folgende Differentialdiagnosen erhalten: akute Dermatitis (n = 1), unspezifische Dermatitis (n = 7), in einem Fall davon konnte eine parasitäre Erkrankung nicht ausgeschlossen werden, dermale Dermatitis (n = 1), chronische Ulzeration (n = 1), granulomatöse Entzündung (n = 1), parasitäre Erkrankung (n = 6, davon n = 4 Onchozerkose). Eine Patientenprobe war aufgrund der schlechten Fixierung nicht auswertbar.

4.2.3.5 Gegenüberstellung der diagnostischen Sensitivitäten von Mikroskopie und PCR

Tabelle 20 zeigt zusammenfassend die gemäß 3.2.2.9 anhand der Gesamtanzahl aller klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle ermittelten unterschiedlichen diagnostischen Sensitivitäten der „Methode Mikroskopie“, der DRB- und Standard-PCR und der „Methode PCR“.

Diagnostische Sensitivität	„Methode Mikroskopie“		DRB-PCR		Standard-PCR		„Methode PCR“ (Konsensus-Ergebnisse)	
	Anzahl	[%]	Anzahl	[%]	Anzahl	[%]	Anzahl	[%]
positive Abstriche	40 / 120	33,3	88 / 120	73,3	98 / 120	81,7	73 / 120	60,8
positive Biopsien	81 / 204	39,7	139 / 204	68,1	150 / 204	73,5	120 / 204	58,8

Tabelle 20 Vergleichsstudie, Diagnostische Sensitivitäten Mikroskopie, DRB- und Standard-PCR, „Methode PCR“

4.2.3.6 Sensitivität von Mikroskopie und DRB-PCR abhängig von Probenart und Läsionstyp

Aufgrund der geringen Kultursensitivität, der extrem langen Untersuchungsdauer, die für die Histopathologie veranschlagt werden muss, und der dieser Arbeit zugrunde liegenden Thematik der Entwicklung einer tropentauglichen DRB-PCR, erschien hier nur die

Gegenüberstellung der diagnostischen Sensitivitäten von Mikroskopie und DRB-PCR sinnvoll.

Es konnten nur komplette „Ergebnisssets“ ausgewertet werden, d. h., das Mikroskopie-Konsensus-Ergebnis musste eindeutig positiv oder negativ sein, also nicht „*not determined*“ (vgl. 3.2.2.8). Im Falle der ulzerativen Läsionen konnten so insgesamt 117 von 120 Ergebnisssets, im Falle der prä-ulzerativen Läsionen 82 von 84 Ergebnisssets ausgewertet werden. Insgesamt wurden Ergebnisssets von 199 Patienten ausgewertet.

19,6 % der Patienten (39 / 199) erreichten nur einen einzigen positiven Test, 51,8 % (103 / 199) wurden durch zwei oder mehr positive Tests bestätigt, 71,4 % der Patienten (142 / 199) wurden durch mindestens einen positiven Test bestätigt, 28,6 % der Patienten (57 / 199) wurden in allen Methoden negativ getestet.

4.2.3.6.1 Prä-ulzerative Läsionen

4.2.3.6.1.1 Vergleich Mikroskopie und DRB-PCR der Biopsien

37,8 % der untersuchten Biopsien prä-ulzerativer Läsionen (31 von 82 Proben) waren mikroskopisch positiv. Durch DRB-PCR der Biopsien wurde ein zusätzlicher diagnostischer Gewinn von 28,0 % (23 / 82 Proben) erreicht. Es konnten 65,9 % (54 / 82 Proben) der klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle laborbestätigt werden. Für 34,1 % der Fälle (28 / 82 Proben) wurden keine positiven Ergebnisse erhalten. Tabelle 21 zeigt die Ergebnisse für jede Methode allein und in Kombination bei prä-ulzerativen Läsionen.

Prä-ulzerative Läsionen		DRB-PCR Biopsien		Gesamt
		positiv	negativ	
Mikroskopie Biopsien	positiv	29	2	31
	negativ	23	28	51
Gesamt		52	30	82

Tabelle 21 Vergleichsstudie, Ergebnisse Mikroskopie und DRB-PCR: Biopsien, prä-ulzerative Läsionen

Es wurde ein OR von 17,65 [95 %-KI: 3,50 – 119,81] und ein p-Wert von < 0,0001 erreicht, die Ergebnisse der beiden Tests sind damit signifikant assoziiert. Der κ -Koeffizient von Cohen zeigte mit einem Wert von 0,43 die Konkordanz der Ergebnisse beider Tests. Vorausgesetzt, dass die 28 Fälle mit durch beide Methoden negativ erhaltenem Testergebnis tatsächlich keine Buruli-Ulkus-Fälle waren, die klinische Diagnose also falsch war, errechnet sich für die Mikroskopie eine Sensitivität von 57,4 % (31 / 54 Proben) und für die DRB-PCR von 94,3 % (52 / 54 Proben).

4.2.3.6.2 Ulzerative Läsionen

4.2.3.6.2.1 Vergleich Mikroskopie der Abstriche und Biopsien

36,9 % der untersuchten Abstriche ulzerativer Läsionen (38 / 117 Proben) waren mikroskopisch positiv. Durch Mikroskopie der Biopsien wurde ein zusätzlicher diagnostischer Gewinn von 23,1 % (23 / 117 Proben) erreicht. Es konnten 52,1 % (61 / 117 Proben) der klinischen Verdachtsfälle labordiagnostisch bestätigt werden. Für 47,9 % der Fälle (56 / 117 Proben) wurden keine positiven Ergebnisse erhalten. Tabelle 22 zeigt die Ergebnisse für jede Probenart allein und in Kombination bei ulzerativen Läsionen.

Ulzerative Läsionen		Mikroskopie Biopsien		Gesamt
		positiv	negativ	
Mikroskopie Abstriche	positiv	27	11	38
	negativ	23	56	79
Gesamt		50	67	117

Tabelle 22 Vergleichsstudie, Ergebnisse Mikroskopie: Abstriche und Biopsien, ulzerative Läsionen

Es wurde ein OR von 5,98 [95 %-KI: 2,36 – 15,42] und ein p-Wert von < 0,0001 erreicht, die Ergebnisse der beiden Tests sind damit signifikant assoziiert. Der κ -Koeffizient von Cohen zeigte mit einem Wert von 0,39 die Konkordanz der Ergebnisse beider Tests. Vorausgesetzt, dass die 56 Fälle mit durch Untersuchung beider Materialien negativ erhaltenem Testergebnis tatsächlich keine Buruli-Ulkus-Fälle waren, die klinische Diagnose also falsch war, errechnet sich für die Mikroskopie der Abstriche eine Sensitivität von 62,3 % (38 / 61 Proben) und für die Mikroskopie der Biopsien von 81,9 % (50 / 61 Proben).

4.2.3.6.2.2 Vergleich Mikroskopie und DRB-PCR der Abstriche

32,5 % der untersuchten Abstriche ulzerativer Läsionen (38 von 117) waren mikroskopisch positiv. Durch DRB-PCR der Abstriche wurde ein zusätzlicher diagnostischer Gewinn von 30,7 % (36 / 117 Proben) erreicht. Es konnten 63,2 % (74 / 117 Proben) der klinischen Verdachtsfälle durch diese Methoden labordiagnostisch bestätigt werden. Für 36,8 % der Fälle (43 / 117 Proben) wurden keine positiven Ergebnisse erhalten. Tabelle 23 zeigt die Ergebnisse für jede Methode allein und in Kombination bei ulzerativen Läsionen.

Ulzerative Läsionen		DRB-PCR Abstriche		Gesamt
		positiv	negativ	
Mikroskopie Abstriche	positiv	33	5	38
	negativ	36	43	79
Gesamt		69	48	117

Tabelle 23 Vergleichsstudie, Ergebnisse Mikroskopie und DRB-PCR: Abstriche, ulzerative Läsionen

Es wurde ein OR von 7,88 [95 %-KI: 2,57 – 25,79] und ein p-Wert von $< 0,0001$ erreicht, die Ergebnisse der beiden Tests sind damit signifikant assoziiert. Der κ -Koeffizient von Cohen zeigte mit einem Wert von 0,34 die Konkordanz der Ergebnisse beider Tests. Vorausgesetzt, dass die 43 Fälle mit durch beide Methoden negativ erhaltenem Testergebnis tatsächlich keine Buruli-Ulkus-Fälle waren, die klinische Diagnose also falsch war, errechnet sich für die Mikroskopie der Abstriche eine Sensitivität von 51,4 % (38 / 74 Proben) und für die DRB-PCR der Abstriche von 93,2 % (69 / 74 Proben).

4.2.3.6.2.3 Vergleich DRB-PCR der Abstriche und DRB-PCR der Biopsien

59,01 % der untersuchten Biopsien ulzerativer Läsionen (69 von 117 Proben) wurden durch DRB-PCR der Abstriche positiv getestet. Durch DRB-PCR der Biopsien wurde ein zusätzlicher diagnostischer Gewinn von 11,1 % (13 / 117 Proben) erreicht. Es konnten 70,1 % (82 / 117 Proben) der klinischen Verdachtsfälle labordiagnostisch bestätigt werden. Für 29,9 % der Fälle (35 / 117 Proben) wurden keine positiven Ergebnisse erhalten. Tabelle 24 zeigt die Ergebnisse für jede Probenart allein und in Kombination bei ulzerativen Läsionen.

Ulzerative Läsionen		DRB-PCR Biopsien		Gesamt
		positiv	negativ	
DRB-PCR Abstriche	positiv	53	16	69
	negativ	13	35	48
Gesamt		66	51	117

Tabelle 24 Vergleichsstudie, Ergebnisse DRB-PCR: Abstriche und Biopsien, ulzerative Läsionen

Es wurde ein OR von 8,92 [95 %-KI: 3,54 – 22,94] und ein p-Wert von $< 0,0001$ erreicht, die Ergebnisse der beiden Tests sind damit signifikant assoziiert. Der κ -Koeffizient von Cohen zeigte mit einem Wert von 0,49 die Konkordanz der Ergebnisse beider Tests. Vorausgesetzt, dass die 35 Fälle mit durch Untersuchung beider Materialien negativ erhaltenem Testergebnis tatsächlich keine Buruli-Ulkus-Fälle waren, die klinische Diagnose also falsch war, errechnet sich für die DRB-PCR der Abstriche eine Sensitivität von 84,1 % (69 / 82 Proben) und für die DRB-PCR der Biopsien von 80,5 % (66 / 82 Proben).

4.2.3.6.2.4 Vergleich Mikroskopie und DRB-PCR der Biopsien

42,7 % der untersuchten Biopsien ulzerativer Läsionen (50 von 117 Proben) waren mikroskopisch positiv. Durch DRB-PCR der Biopsien wurde ein zusätzlicher diagnostischer Gewinn von 21,4 % (25 / 117 Proben) erreicht. Es konnten 64,1 % (75 / 117 Proben) der klinischen Verdachtsfälle labordiagnostisch bestätigt werden. Für 35,9 % der Fälle (42 / 117 Proben) wurden keine positiven Ergebnisse erhalten. Tabelle 25 zeigt die Ergebnisse der Mikroskopie und DRB-PCR der Biopsien für jede Methode allein und in Kombination bei ulzerativen Läsionen.

Ulzerative Läsionen		DRB-PCR Biopsien		Gesamt
		positiv	negativ	
Mikroskopie Biopsien	positiv	41	9	50
	negativ	25	42	67
Gesamt		66	51	117

Tabelle 25 Vergleichsstudie, Ergebnisse Mikroskopie und DRB-PCR: Biopsien, ulzerative Läsionen

Es wurde ein OR von 7,65 [95 %-KI: 2,96 – 20,32] und ein p-Wert von < 0,0001 erreicht, die Ergebnisse der beiden Tests sind damit signifikant assoziiert. Der κ -Koeffizient von Cohen zeigte mit einem Wert von 0,43 die Konkordanz der Ergebnisse beider Tests. Vorausgesetzt, dass die 42 Fälle mit durch beide Methoden negativ erhaltenem Testergebnis tatsächlich keine Buruli-Ulkus-Fälle waren, die klinische Diagnose also falsch war, errechnet sich für die Mikroskopie der Biopsien eine Sensitivität von 66,7 % (50 / 75 Proben) und für die DRB-PCR der Biopsien von 88,0 % (66 / 75 Proben).

4.2.3.6.3 Diagnostischer Gewinn der nachfolgenden Anwendung verschiedener Diagnostik-Methoden

4.2.3.6.3.1 Prä-ulzerative Läsionen

Eine nacheinander erfolgende Anwendung der Mikroskopie (diagnostischer Gewinn 37,8 %) und der DRB-PCR (zusätzlicher diagnostischer Gewinn 28,0 %) bei der Untersuchung der Biopsien erzielte in 65,9 % der Fälle ein positives Ergebnis.

4.2.3.6.3.2 Ulzerative Läsionen

Eine kombinierte, nacheinander erfolgende Untersuchung präoperativ entnommener Abstriche durch Mikroskopie (diagnostischer Gewinn 32,5 %) und DRB-PCR (zusätzlicher diagnostischer Gewinn 30,7 %) erzielte in 63,2 % der Fälle ein positives Ergebnis. Eine

kombinierte, nacheinander erfolgende Untersuchung postoperativ entnommener Biopsien durch Mikroskopie (42,7 %) und der DRB-PCR (zusätzlicher diagnostischer Gewinn 21,4 %) erzielte in 64,1 % der Fälle ein positives Ergebnis. Tabelle 26 verdeutlicht, dass eine kombinierte, nacheinander erfolgende Anwendung von prä- und postoperativen Labormethoden in 74,4 % der Fälle (87 / 117 Proben) ein positives Ergebnis erzielte, für 25,6 % (30 / 117 Proben) konnte kein positives Ergebnis erreicht werden.

Ulzerative Läsionen	Präoperative Labordiagnose			Postoperative Laborbestätigung			Gesamt
	Mik Abstr.	Zusätzl. DG DRB-PCR Abstr.	Keine LD durch Mik Abstr. / DRB-PCR Abstr.	DG Mik Biopsien	Zusätzl. DB PCR Biopsien	Keine zusätzl. LD durch Mik Biopsien / DRB-PCR Biopsien	
DG							NA Mik Abstr., DRB-PCR Abstr., Mik Biopsien DRB-PCR Biopsien
	32,5 % (38/117)	30,7 % (36/117)	36,8 % (43/117)	6,0 % (7/117)	5,1 % (6/117)	25,6 % (30/117)	74,4 % (87/117)

Tabelle 26 Vergleichsstudie, diagnostischer Gewinn, nachfolgende Anwendung prä- und postoperativer Labormethoden

DG: Diagnostischer Gewinn; Abstr.: Abstriche, Mik: Mikroskopie; LD: Labordiagnose; NA: Nachfolgende Anwendung

4.2.3.7 Externe Qualitätskontrolle

Die gemäß 3.2.2.11 ermittelten Ergebnisse der externen Qualitätskontrolle von Mikroskopie und DRB-PCR sind dargestellt.

4.2.3.7.1 Mikroskopie

Nach der 1. Untersuchung wurden 56 Proben zwischen Test- und Kontroll-Labor nicht übereinstimmend bewertet und daher vom Kontroll-Labor wiederholt untersucht. 7 zuvor positive Ergebnisse des Kontroll-Labors wurden anschließend negativ gewertet, so dass, gemessen an der Gesamtanzahl der wiederholten Proben, 7 von 56 Proben (12,5 %) vom Kontroll-Labor revidiert wurden. Tabelle 27 zeigt die Ergebnisse der 1. Untersuchung des Test-Labors, bezogen auf das Endergebnis des Kontroll-Labors.

Ergebnisse der 1. Untersuchung, Test-Labor	Ergebnisse des Kontroll-Labors (Endergebnisse)		Gesamt
	positiv	negativ	
positiv	93	19	112
negativ	30	182	212
Gesamt	123	201	324

Tabelle 27 Vergleichsstudie, Mikroskopie, 1. Untersuchung Test-Labor bezogen auf Endergebnis Kontroll-Labor

Die Positivitätsrate des Test-Labors betrug 28,7 % (93 / 324 Proben), 55,9 % der Proben (182 / 324 Proben) wurden negativ getestet. Der κ -Koeffizient von Cohen zeigte mit einem Wert von 0,67 die Konkordanz der Ergebnisse der beiden Untersuchungen: Die Übereinstimmungsrate zwischen Test- und Kontroll-Labor nach der 1. Untersuchung wurde mit 84,9 % (275 / 324 Proben) bestimmt, die Abweichungsrate betrug 15,1 % (49 / 324). Es wurden 24,4 % (30 / 123) falsch-negative Ergebnisse und 9,5 % (19 / 201 Proben) falsch-positive Ergebnisse des Test-Labors erhalten, was einer Sensitivität von 75,6 % (93 / 123) und einer Spezifität von 90,5 % (182 / 201 Proben) entsprach. Der positive Prädikativwert betrug 83,0 % (93 / 112 Proben), der negative Prädikativwert 85,8 % (182 / 212 Proben). Die positive LR wurde mit 8,0 ($93 \times 201 / 123 \times 19$) die negative LR mit 0,27 ($30 \times 201 / 123 \times 182$) ermittelt. Tabelle 28 zeigt die Ergebnisse des Test-Labors der 2. Untersuchung der Proben mit diskrepanten Ergebnissen des Test-Labors, bezogen auf das Endergebnis des Kontroll-Labors.

Ergebnisse der 2. Untersuchung einzelner Proben, Test-Labor	Ergebnisse des Kontroll-Labors		Gesamt
	positiv	negativ	
positiv	26	1	27
negativ	4	18	22
Gesamt	30	19	49

Tabelle 28 Vergleichsstudie, Mikroskopie, Ergebnisse Test-Labor 2. Untersuchung der Proben mit diskrepanten Ergebnissen des Test-Labors bezogen auf Endergebnis Kontroll-Labor

Durch die Wiederholung der Untersuchung von 49 diskrepanten Proben des Testlabors wurden 26 von 30 zuvor falsch-negativ gewertete Proben positiv gefunden, 18 von 19 zuvor falsch-positiv beurteilte Proben wurden negativ gewertet, d.h. 89,8 % der zuvor diskrepanten Ergebnisse wurden durch das Test-Labor revidiert, dies entspricht einer Sensitivität von 86,7 % (26 / 30 Proben) und einer Spezifität von 94,7 % (18 / 19 Proben). Der κ -Koeffizient von Cohen zeigte mit einem Wert von 0,79 die Konkordanz der Ergebnisse der beiden Untersuchungen: Die Übereinstimmungsrate betrug 89,8 % (44 / 49 Proben), die

Abweichungsrate 10,2 % (5 / 49 Proben). Der positive Prädikativwert wurde mit 96,3 % (26 / 27 Proben) bestimmt, der negative Prädikativwert mit 81,8 % (18 / 22 Proben). Die positive LR betrug 16,47 ($26 \times 19 / 30 \times 1$), die negative LR 0,14 ($4 \times 19 / 30 \times 18$). Tabelle 29 zeigt die Ergebnisse des Test-Labors nach der 2. Untersuchung der Proben mit diskrepanten Ergebnissen des Test-Labors, bezogen auf das Endergebnis des Kontroll-Labors.

Ergebnisse nach 2. Untersuchung einzelner Proben, Testlabor	Ergebnisse des Kontroll-Labors		Gesamt
	positiv	negativ	
positiv	119	1	120
negativ	4	200	204
Gesamt	123	201	324

Tabelle 29 Vergleichsstudie, Mikroskopie, Ergebnisse Test-Labor nach 2. Untersuchung der Proben mit diskrepanten Ergebnissen des Test-Labors bezogen auf Endergebnis Kontroll-Labor

Der Prozentsatz der falsch-negativen Ergebnisse reduzierte sich von 24,4 % auf 3,3 % (4 / 123 Proben), der Prozentsatz der falsch-positiven Ergebnisse sank von 9,5 % auf 0,5 % (1 / 201 Proben), dies entspricht einer Sensitivität von 96,7 % (119 / 123 Proben) und einer Spezifität von 99,5 % (200 / 201 Proben). Der κ -Koeffizient von Cohen zeigte mit einem Wert von 0,97 die Konkordanz der Ergebnisse der beiden Untersuchungen: Die 2. Untersuchung führte zu einer Übereinstimmungsrate zwischen Test- und Kontroll-Labor von 98,5 % (319 / 324 Proben) und einer Abweichungsrate von 1,5 % (5 / 324 Proben). Der positive Prädikativwert betrug 99,2 % (119 / 120 Proben), der negative Prädikativwert 98,0 % (200 / 204 Proben). Es wurde eine positive LR von 194,5 ($119 \times 201 / 123 \times 1$) sowie eine negative LR von 0,03 ($4 \times 201 / 123 \times 200$) erreicht.

4.2.3.7.2 PCR

Nach der 1. Untersuchung wurden 60 Proben zwischen Test- und Kontroll-Labor nicht übereinstimmend bewertet und daher vom Kontroll-Labor wiederholt untersucht. 7 zuvor positive Ergebnisse des Kontroll-Labors wurden anschließend negativ gewertet, 9 zuvor negativ getestete Proben wurden nun positiv gewertet, so dass, gemessen an der Gesamtanzahl der wiederholten Proben, 26,7 % (16 / 60 Proben) vom Kontroll-Labor revidiert wurden. Tabelle 30 zeigt die Ergebnisse der 1. Untersuchung des Test-Labors, bezogen auf das Endergebnis des Kontroll-Labors.

Ergebnisse der 1. Untersuchung, Test-Labor	Ergebnisse des Kontroll-Labors (Endergebnis)		Gesamt
	positiv	negativ	
positiv	187	22	209
negativ	22	93	115
Gesamt	209	115	324

Tabelle 30 Vergleichsstudie, PCR, 1. Untersuchung Test-Labor bezogen auf Endergebnis Kontroll-Labor

Die Positivitätsrate des Test-Labors betrug 57,7 % (187 / 324 Proben), 28,7 % der Proben (93 / 324 Proben) wurden negativ getestet. Der κ -Koeffizient von Cohen zeigte mit einem Wert von 0,70 die Konkordanz der Ergebnisse der beiden Untersuchungen: Die Übereinstimmungsrate zwischen Test- und Kontroll-Labor nach der 1. Untersuchung wurde mit 86,4 % (280 / 324 Proben) bestimmt, die Abweichungsrate betrug 13,6 % (44 / 324 Proben). Es wurden 10,5 % (22 / 209 Proben) falsch-negative Ergebnisse und 19,1 % (22 / 115 Proben) falsch-positive Ergebnisse des Test-Labors erhalten, dies entspricht einer Sensitivität von 89,5 % (187 / 209) und einer Spezifität von 80,9 % (93 / 115 Proben). Der positive Prädikativwert betrug 85,4 % (187 / 219 Proben), der negative Prädikativwert 80,9 % (93 / 115 Proben). Die positive LR wurde mit 4,68 ($187 \times 115 / 209 \times 22$), die negative LR mit 0,14 ($22 \times 115 / 209 \times 93$) ermittelt. Tabelle 31 zeigt die Ergebnisse des Testlabors der 2. Untersuchung der Proben mit diskrepanten Ergebnissen des Test-Labors, bezogen auf das Endergebnis des Kontroll-Labors nach der 2. Untersuchung der Proben mit diskrepanten Ergebnissen des Test-Labors.

Ergebnisse der 2. Untersuchung einzelner Proben, Test-Labor	Ergebnisse des Kontroll-Labors		Gesamt
	positiv	negativ	
positiv	10	3	13
negativ	12	19	31
Gesamt	22	22	44

Tabelle 31 Vergleichsstudie, PCR, Ergebnisse Test-Labor 2. Untersuchung der Proben mit diskrepanten Ergebnissen bezogen auf Endergebnis Kontroll-Labor

Durch die Wiederholung der Untersuchung von 44 diskrepanten Proben des Testlabors wurden 10 von 22 zuvor falsch-negativ gewertete Proben positiv gefunden, 19 von 22 zuvor falsch-positiv beurteilte Proben wurden negativ gewertet, d.h. 65,9 % der zuvor diskrepanten Ergebnisse wurden durch das Test-Labor revidiert. Die Sensitivität betrug 45,5 % (10 / 22 Proben), die Spezifität 86,4 % (19 / 22 Proben). Der κ -Koeffizient von Cohen zeigte mit einem Wert von 0,32 die Konkordanz der Ergebnisse der beiden Untersuchungen: Die

Übereinstimmungsrate betrug 65,9 % (29 / 44), die Abweichungsrate 34,1 % (15 / 44 Proben). Der positive Prädikativwert wurde mit 76,9 % (10 / 13 Proben) bestimmt, der negative Prädikativwert mit 61,3 % (19 / 31 Proben). Die positive LR betrug 3,33 ($10 \times 22 / 22 \times 3$), die negative LR 0,68 ($12 \times 22 / 22 \times 19$). Tabelle 32 zeigt die Ergebnisse des Test-Labors nach der 2. Untersuchung der Proben mit diskrepanten Ergebnissen des Test-Labors, bezogen auf das Endergebnis des Kontroll-Labors.

Ergebnisse nach 2. Untersuchung einzelner Proben, Test-Labor	Ergebnisse des Kontroll-Labors		Gesamt
	positiv	negativ	
positive	197	3	200
negativ	12	112	124
Gesamt	209	115	324

Tabelle 32 Vergleichsstudie, PCR, Ergebnisse Test-Labor nach 2. Untersuchung der Proben mit diskrepanten Ergebnissen bezogen auf Endergebnis Kontroll-Labor

Der Prozentsatz der falsch-negativen Ergebnisse reduzierte sich von 11,0 % auf 5,7 % (12 / 209 Proben), der Prozentsatz der falsch-positiven Ergebnisse sank von 19,3 % auf 2,6 % (3 / 115 Proben), dies entspricht einer Sensitivität von 94,3 % (197 / 209 Proben) und einer Spezifität von 98,5 % (112 / 115 Proben). Der κ -Koeffizient von Cohen zeigte mit einem Wert von 0,90 die Konkordanz der Ergebnisse der beiden Untersuchungen: Die 2. Untersuchung führte zu einer Übereinstimmungsrate zwischen Test- und Kontroll-Labor von 95,4 % (309 / 324 Proben) und einer Abweichungsrate von 4,6 % (15 / 324 Proben). Der positive Prädikativwert betrug 98,5 % (197 / 200 Proben), der negative Prädikativwert 90,3 % (112 / 124 Proben). Es wurde eine positive LR von 36,13 ($197 \times 115 / 209 \times 3$) sowie eine negative LR von 0,06 ($12 \times 115 / 209 \times 112$) erreicht.

4.3 Untersuchung der Ausbreitung von *M. ulcerans* in die angrenzende Umgebung des Geschwürs

4.3.1 „Gradienten“-Proben

Es wurden 83 gemäß 3.2.2.15 entnommene Gradientenproben von 20 laborbestätigten Buruli-Ulkus-Patienten durch PCR und Histopathologie untersucht. In 82 Segmenten (98,8 %) wurden histopathologisch Zeichen einer *M. ulcerans*-Infektion bestätigt. Durch PCR konnte in 76 Segmenten (91,6 %) *M. ulcerans*-DNA nachgewiesen werden. Ein Segment wurde durch PCR und Histopathologie übereinstimmend negativ gefunden, obwohl die beiden angrenzenden Segmente positive Ergebnisse bei beiden Tests lieferten. In sechs histopathologisch positiven Segmenten (7,3 %) erzielte die PCR ein negatives Ergebnis. Tabelle 34 im Anhang stellt die Ergebnisse dar, negative Ergebnisse sind fett gedruckt.

Die Übereinstimmungsrate der Ergebnisse von PCR und Histopathologie betrug 92,7 %, es wurden insgesamt 77 von 83 Gradientensegmenten durch beide Methoden übereinstimmend befundet. Es wurden 76 von 83 Gradientensegmente durch PCR und Histopathologie positiv gefunden (91,6 %).

Im Einzelnen wurden folgende Ergebnisse erhalten: 16 der 20 (80 %) untersuchten Gradientenprobensets zeigten sowohl durch PCR als auch durch Histopathologie einen positiven Nachweis für *M. ulcerans* in allen Gradientensegmenten. Drei von 20 (15 %) der untersuchten Gradientenprobensets wurden mittels PCR partiell positiv und mittels Histopathologie komplett positiv befundet. Ein Gradientenprobenset wurde partiell sowohl in PCR als auch in Histopathologie gefunden.

Im peripheren Gradientensegment konnten durch Histopathologie in allen Fällen (20 von 20 Proben) AFB nachgewiesen werden, wobei die Quantität der Bakterien meist vom zentralen Segment zur Peripherie abnahm. Durch PCR konnte in 17 von 20 (85 %) peripheren Segmenten *M. ulcerans*-DNA nachgewiesen werden.

4.3.2 Exzisionsränder

Aus anatomischen Gründen konnten nur 16 der 20 Exzisionsrand-Sets mittels PCR untersucht und ausgewertet werden. Den Proben der vier übrigen Patienten fehlte entweder das subkutane adipöse Fettgewebe oder die Exzisionsränder waren derart zerstückelt, dass es nicht möglich war, eine den Einschlusskriterien entsprechende Probenabnahme durchzuführen. Es war weiterhin nicht möglich, drei parallele Proben-Sektionen zu entnehmen, da die Vergleichbarkeit der Proben unter diesen Bedingungen nicht sicherzustellen war.

In 10 der 16 Sets (62,5 %) waren alle untersuchten Exzisionsrandsegmente positiv. Bei einem Set waren mehr als 50 % der Randsegmente PCR-positiv, nämlich 14 von 20 Segmenten (70 %). In fünf Fällen wurden weniger als 50 % der Randsegmente positiv getestet (1 x 1 / 6 Segmenten positiv (16 %); 1 x 7 / 19 Segmenten positiv (37 %) bei 3 inhibierten Reaktionen; 1 x 2 / 25 Segmenten positiv (8 %) bei 2 inhibierten Reaktionen, 1 x 1 / 20 Segmenten positiv (5 %) bei 9 inhibierten Reaktionen; 1 x 7 / 20 Segmenten positiv (35 % bei 3 inhibierten Reaktionen). In keinem Fall waren alle Exzisionsrandsegmente komplett negativ.

5 Diskussion

5.1 Aussagekraft und Zuverlässigkeit der Untersuchungen

5.1.1 Entwicklung, Validierung und Etablierung einer an tropische Bedingungen adaptierten PCR zum Nachweis von *M. ulcerans*

Gegenwärtig beschränken sich Kontroll-Strategien in Buruli-Ulkus endemischen Ländern auf die chirurgische Behandlung klinisch diagnostizierter Fälle (7, 38, 48, 87, 88). Ein diagnostischer Gold-Standard zur Laborbestätigung dieser Verdachtsfälle existiert nicht, sensitive Diagnostikmethoden wie Histopathologie oder PCR sind meist nicht verfügbar (38, 87). Verzögerte Diagnosestellung und Fehldiagnosen können die Folge sein. Eine retrospektive Studie, die in der Ashanti-Region in Ghana zwischen 1994 und 1996 durchgeführt wurde, verdeutlicht, dass die Behandlungskosten eines ausgedehnten Buruli-Ulkus inklusive Operation, Verpflegung des Patienten und Hospitalisierung bis zu US \$ 780 betragen können, vergleichsweise niedrig wurden die Kosten der Behandlung früher Krankheitsstadien mit US \$ 20 – US \$ 30 bestimmt (7). Es werden daher dringend verlässliche, einfach durchzuführende Labormethoden zur Bestätigung von klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus-Verdachtsfällen im frühen Krankheitsstadium benötigt.

Die Durchführung konventioneller PCR-Techniken ist unter tropischen Bedingungen mit besonderen Schwierigkeiten behaftet. Transport und Lagerung der Reagenzien setzen eine technische Ausstattung (wie beispielsweise Kühl- und Gefriermöglichkeiten) voraus, die in vielen Endemiegebieten nicht selbstverständlich zur regulären Ausrüstung eines Labors zählen. Weiterhin müssen zur Stabilisierung der unzuverlässigen Stromversorgung Generatoren und Spannungsregulatoren vorhanden sein, um wiederholtes Auftauen und Einfrieren der temperaturempfindlichen PCR-Reagenzien durch Stromausfälle zu vermeiden. Dazu kommt, dass selbst geübtes Laborpersonal bei der Anwendung der konventionellen PCR-Technik sehr sorgfältig arbeiten muss, um eine stets vergleichbare Reagenzienqualität und verlässlich auswertbare Ergebnisse zu gewährleisten. Besondere Vorsicht muss zur Minimierung bzw. Vermeidung des DNA-Kontaminationsrisikos gewahrt werden. Nicht zuletzt erschweren die begrenzten finanziellen Möglichkeiten der Gesundheitssektoren der Endemiegebietsregionen die Etablierung und Routineanwendung dieser Technik zusätzlich.

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebene, auf Trockenreagenzien basierende DRB-PCR wurde ausgehend von der derzeitigen Standard-PCR (72, 87) zum diagnostischen Nachweis von *M. ulcerans* in Patientenproben entwickelt. Die DRB-PCR ist aufgrund ihrer

vereinfachten Handhabung perfekt an tropische Bedingungen angepasst: Die Durchführung der DRB-PCR vereinfacht sich im Vergleich zur Standard-PCR dahingehend, dass das komplette Reagenziengemisch nur in Form der „*PuReTaq Ready-To-Go-PCR-Beads*“ verarbeitet werden muss. Damit minimiert sich das vor allem bei diagnostischen PCRs zu berücksichtigende Kontaminationsrisiko, denn statt bis zu acht verschiedenen Reagenzien, wie in konventionellen PCR-Ansätzen, werden lediglich Wasser, DNA und die *Beads* zu den schon vorher in die PCR-Reaktionsgefäße lyophilisierten Primern zugegeben. Alle Reagenzien und Materialien der DRB-PCR sind bei Raumtemperatur lagerbar, es sind weder Kühl- oder Gefriergeräte noch Generatoren o. ä. zusätzliche Ausstattung erforderlich. Besonders wichtig ist damit auch, dass die Qualität der Reagenzien und damit der PCR immer identisch ist.

Das durch die „*PuReTaq Ready-To-Go-PCR-Beads*“ festgelegte Reaktionsgemisch der DRB-PCR weicht nur geringfügig von dem der Standard-PCR ab, die Konzentrationsverhältnisse der *Beads* wurden jedoch absichtlich nicht denen der Standard-PCR durch z.B. den Zusatz von $MgCl_2$ angeglichen, um den Vorteil der vereinfachten Durchführung der Methode und der Lagerung der Materialien beizubehalten.

Die Validierungsphase I der DRB-PCR konnte zeigen, dass diese PCR-Methode der Standard-PCR hinsichtlich Spezifität und Sensitivität gleichzusetzen war. Abweichende Ergebnisse zwischen beiden PCR-Methoden waren auf die zu diesem Zeitpunkt noch nicht standardisierte Probenentnahme zurückzuführen, so dass Proben für beide PCR-Techniken teilweise an unterschiedlichen Bereichen der Läsionen entnommen worden waren. Wie sich erst im späteren Verlauf der Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit herausstellte, sind nicht alle Entnahmestellen gleichermaßen zu diagnostischen Zwecken geeignet. Diese Vermutung bestätigte sich durch die Ergebnisse von Validierungsphase II, die nach Etablierung der DRB-PCR am KCCR zur der Überprüfung der tropentauglichen Anwendung durchgeführt wurde. Die ermittelten Übereinstimmungsraten zeigen, dass die DRB-PCR unter der Voraussetzung der optimalen Probenqualität eine auch unter tropischen Bedingungen verlässliche diagnostische Methode darstellt. Die zahlreichen Vorteile der DRB-PCR wiegen auch die im Vergleich zur Standard-PCR geringfügig höheren Materialkosten von ca. 2 – 3 € auf.

Während der Validierungsphasen der DRB-PCR wurden alle klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle in die Studie integriert und keine spezifischen Einschluss- oder Selektionskriterien wie Läsionstyp, Erkrankungsdauer oder Probenqualität angewandt. Bei der histopathologischen Untersuchung der PCR-negativen Biopsieproben konnten 40 % der

Proben zur eindeutigen Beurteilung aufgrund des fehlenden subkutanen Fettgewebes nicht ausgewertet werden. Eine Probe dieser Qualität wäre auch mittels PCR negativ erschienen, da *M. ulcerans* nur in der Subkutis nachweisbar sind. Bei 1/3 der Proben wurde histopathologisch, allerdings ausschließlich anhand der Buruli-Ulkus typischen Gewebsveränderungen, eine Buruli-Ulkus-Infektion nachgewiesen, in keinem Fall wurden dabei AFB gefunden. Diese Befunde können auch die relativ niedrige diagnostische Sensitivität der DRB-PCR während der Validierung erklären. Es ist anzunehmen, dass eine fortgeschrittene Erkrankungsdauer die diagnostische Sensitivität der PCR stark beeinträchtigt, so dass in älteren Läsionen, die sich im inaktiven, sog. Heilungsstadium befinden, keine oder nur noch sehr wenige Bakterien nachweisbar sind und so ein positiver Nachweis mittels PCR schwierig ist. Die Erkrankungsdauer betrug bei fast 50 % der untersuchten Patienten mehr als sechs Monate oder war unklar. Zur PCR-Diagnose der Erkrankung erscheinen daher frühe Läsionen geeigneter als ältere.

Es wurde außerdem deutlich, dass eine optimale Probenqualität von entscheidender Wichtigkeit für die Labordiagnose des Buruli-Ulkus ist, und nur anhand von genau definierten Kriterien zur Probenentnahme erreicht werden kann.

5.1.2 Durchführung einer vergleichenden Studie aller zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden zum Nachweis von *M. ulcerans*

Nach Erhalt der viel versprechenden Ergebnisse der Validierungsphase I und II der DRB-PCR sollte diese Methode nun anhand der Untersuchung eines größeren Patientenkollektivs mit allen anderen derzeit zur Verfügung stehenden und von der WHO empfohlenen diagnostischen Methoden zur Detektion des Buruli-Ulkus verglichen werden (87). Die Ergebnisse der einzelnen Methoden sollten später gegenübergestellt werden, so dass es, ausgehend von den Erkenntnissen der vorhergegangenen Studie, von entscheidender Wichtigkeit war, die Vergleichbarkeit des Probenmaterials zu gewährleisten. Es wurde daher zu Beginn der Studie eine umfassende Studienlogistik entwickelt, die standardisierte Kriterien zur Probenabnahme, zum Probentransport und der Probenverarbeitung umfasste. So wurde sichergestellt, dass einerseits jeder einzelnen Methode eine eigene Probe zur Untersuchung bereitgestellt werden konnte, speziell für jede Untersuchungsmethode optimierte Lagerungsbedingungen der Proben vorherrschten und aufgrund der Abnahmetechnik trotzdem hinsichtlich Qualität und Probenbeschaffenheit maximal vergleichbare Proben für alle Tests gewonnen werden konnten. Die spätere Vergleichbarkeit der Ergebnisse war damit bestmöglich erreicht.

Auch die Auswertung der Ergebnisse und Qualitätskontrollmaßnahmen wurden schon zu Beginn der Studie für die gesamte Laufzeit definiert, so dass auch die Ergebnisqualität zu jedem Zeitpunkt der Studie vergleichbar angenommen werden konnte.

Ein weiteres Problem über Jahre angelegter Studien ist zweifellos die Patientenrekrutierung, die von Beginn bis zum Ende der Studie konstant sein muss. Durch die Mitarbeit von freiwilligen Helfern des ghanaischen Gesundheitssystems, so genannten „*village health workers*“, konnten Buruli-Ulkus-Patienten in ihrem Heimatdörfern aufgefunden und in die teilweise weit entfernten Krankenhäuser begleitet werden. Die zu Beginn der Studie im Rahmen von Workshops im Erkennen von Buruli-Ulkus-Patienten ausgebildeten freiwilligen Rekrutierungshelfer sicherten die direkt im Anschluss an die Schulungen begonnene Patienten- und Probensammlung, so dass diese während der gesamter Studienlaufzeit als konstant eingeschätzt werden konnten.

Patientenkollektiv

Zu Beginn waren zwei Behandlungszentren in die Studie integriert, die Krankenhäuser aus Dunkwa und Agogo. Im Laufe der Studie wurde die Studienregion auf vier Behandlungszentren ausgedehnt, von denen unterschiedliche Anzahlen von Proben erhalten wurden. Dies lag daran, dass das Patientenaufkommen in den verschiedenen Studienregionen unterschiedlich hoch war. Die meisten Patientenproben wurden aus Dunkwa und Agogo erhalten. Die Probensammlung im Krankenhaus von Goaso konnte nur temporär erfolgen, denn nicht immer waren in diesem Behandlungszentrum Chirurgen vor Ort. Das Krankenhaus von Agroyesum kam erst zum Ende der Studie als Behandlungszentrum hinzu, aus diesem Grund wurden von dort weniger Proben erhalten. Insgesamt wurden in allen Behandlungszentren weniger prä-ulzerative als ulzerative Erkrankungsstadien behandelt. Dies spricht dafür, dass die Erkrankung im frühen Stadium von den Patienten noch als harmlos empfunden wird und eine Behandlung, inklusive eines kostenaufwändigen Krankenhausaufenthaltes, noch nicht angestrebt wird. Aus Goaso wurden geringfügig mehr prä-ulzerative Läsionsproben erhalten als im Durchschnittsanteil vom Gesamtkollektiv, dies könnte daran liegen, dass bei Verfügbarkeit der Chirurgen bevorzugt Patienten der früheren Erkrankungsstadien behandelt wurden, da diese nicht stationär behandelt werden mussten und nach dem Eingriff wieder in ihre Dörfer zurückkehren konnten. Der Anteil der prä- und ulzerativen Läsionen aus Agroyesum ist aufgrund der insgesamt geringeren Probenanzahl nicht repräsentativ.

Mikroskopie

Mit beiden Probenmaterialien, Abstrich und Biopsie, konnten beim Ergebnisvergleich zwischen lokalem und externem Referenzlabor sehr hohe Konsensus-Ergebnisraten erzielt werden. Die diagnostische Sensitivität betrug dagegen, abhängig vom untersuchten Material, nur 33 - 40 %. Dies entspricht jedoch bekannten Normwerten, aufgrund derer die Mikroskopie als vergleichsweise wenig sensitive Diagnostikmethode eingestuft wird (87).

Kultur

Die sehr geringe Anzahl der positiven Kulturen erscheint zunächst überraschend. Eine mögliche Ursache könnte eine zu lange Lagerung der Proben im Transportmedium bis zur Verarbeitung sein. Ein anderer Grund zur Erklärung der geringen Kulturausbeute scheint jedoch plausibler. Eine kürzlich beendete Langzeitüberwachungs-Studie (nicht Teil dieser Arbeit), im Rahmen derer die Studienpatienten wieder aufgesucht und hinsichtlich Rezidiven befragt wurden, zeigt, dass der Mehrzahl der Patienten antimykobakterielle Medikamente vor der Operation, meist Rifampicin, verordnet wurde. Die Gabe von antimykobakteriellen Medikamenten könnte zur Reduktion der Bakterienlast geführt haben, wodurch sich die Sensitivität des Kulturnachweises reduziert haben könnte.

Die Medikamentengabe geht nicht immer aus den Patientenakten der Krankenhäuser hervor und erfolgte nicht standardisiert. Auch wenn derzeit keine alleinige medikamentöse Behandlungsmöglichkeit des Buruli-Ulkus existiert, empfiehlt die WHO eine Kombinationsgabe aus Rifampicin und Streptomycin zur präoperativen unterstützenden Behandlung, beispielsweise zur Reduktion von Ödemen, Standards zur Medikamentengabe sind jedoch noch nicht erprobt (90). Eine gerade begonnene Therapiestudie in Ghana wird dieser Thematik nachgehen (war nicht Teil dieser Arbeit).

Die Ergebnisse legen nahe, dass zukünftige Kulturdiagnostik ausschließlich bei unbehandelten Patienten erfolgen sollte, d.h. die Probenabnahme sollte vor der Medikamentengabe durchgeführt werden.

PCR

Die *Inter-Assay*-Übereinstimmungsraten zwischen DRB- und Standard-PCR betragen, abhängig vom Untersuchungsmaterial, > 95 %. Die im Vergleich zu den Biopsien niedrigere Übereinstimmungsrate der Abstriche könnte sich dadurch erklären, dass für jede PCR-Methode eigene Proben verwendet wurden. Auch wenn die Probenabnahmestelle der Abstriche durch den unterminierten Rand der Läsion definiert ist, könnte bei der Abnahme

mehrerer Abstrichen an relativ trockenen Wundrändern nicht ausreichend Material vorhanden gewesen sein. Die PCR stellt zwar eine sehr sensitive Methode dar, bei sehr wenig Ausgangsmaterial könnten jedoch schwach positive Reaktionen als negatives Ergebnis fehlinterpretiert werden, wodurch sich geringfügig niedrigere Übereinstimmungsraten erklären.

Im Vergleich mit der vorhergehenden Entwicklungs- und Validierungsstudie der DRB-PCR wurden erfreulicherweise sehr hohe diagnostische Sensitivitätswerte von $> 70\%$, abhängig von der untersuchten Probenart, erreicht. Die Ergebnisse sind vermutlich nicht nur auf die höhere Anzahl der getesteten Patienten, sondern besonders auf die bereits verbesserte und standardisierte Probenlogistik zurückzuführen. Es wird deutlich, dass die Probenentnahmetechnik und -lagerung die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zweier unabhängig voneinander durchgeführter Tests stark beeinflusst.

Trotzdem wurde eine niedrigere diagnostische Sensitivität für Biopsien als für Abstriche erreicht. Da dies jedoch gleichermaßen für Standard- und DRB-PCR festzustellen war, scheint dieses Ergebnis nicht auf die jeweilige Methode, sondern auf das Untersuchungsmaterial zurückzugehen. Es ist in diesem Zusammenhang zu berücksichtigen, dass als Einschlusskriterium lediglich die klinische Diagnose zu Grunde gelegt wurde. Im ulzerativen Stadium der Erkrankung kann anhand der typischen unterminierten Ränder die klinische Diagnose Buruli-Ulkus relativ zweifelsfrei gestellt werden, was durch die Laboranalyse der Patientenproben gezeigt werden konnte und aus diesem Grund zu höheren diagnostischen Sensitivitätswerten geführt haben könnte. Prä-ulzerative Hautveränderungen, bei denen kein Abstrich zur Diagnose herangezogen werden kann, können klinisch leicht mit ähnlich erscheinenden Erkrankungen verwechselt werden. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass das Behandlungszentrum Dunkwa innerhalb eines Onchozerkose-Endemiegebietes liegt. Die klinischen Zeichen der Onchozerkose und das prä-ulzerative Stadium des Buruli-Ulkus sind differentialdiagnostisch sehr ähnlich und auch für erfahrene Chirurgen schwer voneinander zu unterscheiden. Möglicherweise sank also die diagnostische Sensitivität der PCR-Methoden in diesem Fall durch falsch gestellte klinische Diagnosen. Eine eindeutige Differentialdiagnose der negativ getesteten Patienten kann jedoch nur durch die Histopathologie gestellt werden, die in Endemiegebieten meist nicht verfügbar ist.

Allgemein kann man beim Vergleich der diagnostischen Sensitivitäten der DRB-PCR und der Standard-PCR sagen, dass die Standard-PCR anhand beider Untersuchungsmaterialien mehr Verdachtsfälle bestätigen konnte als die DRB-PCR. Die bis zu 8% niedrigere diagnostische Sensitivität der DRB-PCR wird jedoch durch die Vorteile der tropenadaptierten Anwendung aufgewogen.

Zur verlässlichen Auswertung und dem zweifelsfreien Ausschluss von falsch-positiven Ergebnissen müsste ebenfalls die Histopathologie zum Vergleich hinzugezogen werden.

Histopathologie

Bei sechs der 12 untersuchten prä-ulzerativen Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle, die durch Mikroskopie und PCR negativ getestet wurden, wurde eine parasitäre Erkrankung diagnostiziert, davon wurden vier Fälle als Onchozerkose-Nodules bestätigt. Dieser Befund untermauert die Vermutung, dass die diagnostischen Sensitivitäten beider Methoden durch das Einschließen von Patienten anderer Erkrankungen vermindert wurden und eigentlich höher liegen müssten als die Daten dieser Arbeit darlegen.

Leider standen bei Beendigung der Datenauswertung immer noch nicht alle histopathologischen Ergebnisse zur Verfügung, so dass an dieser Stelle nur spekuliert werden kann, wie weit klinische Fehldiagnosen die Sensitivitäten diagnostischer Methoden beeinflussten. Auch die geringe diagnostische Sensitivität von 65,5 % der Histopathologie ist darauf zurückzuführen, dass nicht alle Ergebnisse zur Auswertung zur Verfügung standen.

Nacheinander durchgeführte Anwendung von Mikroskopie und PCR

Die derzeitigen WHO-Empfehlungen zur gesicherten Labordiagnose des Buruli-Ulkus erfordern zwei positive Laborergebnisse (87). Anhand der im Rahmen dieser Studie erhaltenen Ergebnisse wird deutlich, dass ca. 20 % mehr Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle durch Mikroskopie und PCR bestätigt werden könnten, wenn nur ein positiver Test als ausreichend angesehen würde. Da strukturelle, technische und finanzielle Beschränkungen eine umfassende Labordiagnose in Endemiegebieten erschweren, erscheint es daher sinnvoll, die bestehenden Empfehlungen zu überdenken.

Die DRB-PCR erscheint zwar ca. doppelt so sensitiv wie die Mikroskopie, da letztere aber weitaus kostengünstiger ist (ca. 2 € im Vergleich zu ca. 10 - 13 € bei der DRB-PCR) und in endemischen Regionen im Routinebetrieb vieler Labore angewendet wird, wäre ihre Anwendung mit gewissen Einschränkungen sinnvoll. Trotz geringerer Sensitivität können durch Mikroskopie viele Verdachtsfälle zweifelsfrei bestätigt werden, so dass lediglich der Anteil der mikroskopisch negativen Proben einer 2. Untersuchung durch eine andere diagnostische Methode unterzogen werden müsste. Anhand der Untersuchung der Biopsien bei prä-ulzerativen Läsionen könnten durch Mikroskopie > 35 % der Verdachtsfälle laborbestätigt werden, eine anschließende Untersuchung durch PCR würde in einem zusätzlichen diagnostischen Gewinn von bis zu 30 % resultieren. Würden Patienten mit

ulzerativen Läsionen zunächst einer präoperativen mikroskopischen Untersuchung der Abstriche unterzogen, resultierte dies in bis zu 35 % positiver Ergebnisse, die Untersuchung der mikroskopisch negativen Patientenproben durch PCR der Abstriche resultierte in einem zusätzlichen diagnostischen Gewinn von > 30 %. Die Untersuchung der danach noch verbliebenen negativ getesteten Verdachtsfälle (ca. 35%) könnte postoperativ durch mikroskopische Untersuchung von Biopsien erfolgen, was jedoch nur noch einem zusätzlichen diagnostischen Gewinn von 6 % entspräche. Eine zusätzliche PCR der Biopsien erbrächte anschließend noch ca. 5 % weiteren diagnostischen Gewinn und erscheint daher aufgrund der Kosten und dem relativ hohen Laboraufwand nicht empfehlenswert. Durch eine Kombination von prä- und postoperativen Labormethoden könnten bis zu 75 % der Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle laborbestätigt werden.

Die verbleibenden negativ getesteten Proben könnten zweifelsfrei nur durch Histopathologie bestätigt werden.

Der entscheidende Vorteil der beschriebenen nacheinander und schrittweise durchgeführten Diagnostik wäre die bedeutende Kostenersparnis im Gegensatz zur parallelen Untersuchung mit allen zur Verfügung stehenden Methoden. Es wäre weiterhin denkbar, dass auch bei prä-ulzerativen Läsionen, z. B. durch die Verwendung von Punch-Biopsie-Nadeln, präoperativ Proben entnommen und untersucht würden. Allerdings sind dabei wiederum die Kosten für Punch-Biopsie-Nadeln (ca. 2 – 3 €) zu berücksichtigen. Bei sehr kleinen Läsionen wäre die Entnahme von Punch-Biopsien ohnehin nicht möglich, da die geringe Oberfläche der Läsion nicht ausreichend zur Entnahme mehrerer Proben wäre.

Externe Qualitätskontrolle

Maßnahmen zur externen Qualitätskontrolle für Mikroskopie und PCR wurden zu Beginn der Studie erarbeitet und festgelegt, um die Ergebnisqualität während der Laufzeit der Studie zu gewährleisten. Da die Ergebnisse der Studie dem ghanaischen Gesundheitssystem zur Verfügung gestellt werden sollten, musste besonders die Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gesichert sein. Fehlerhaft interpretierte Ergebnisse sollten schnell identifiziert und durch Supervision ausgeräumt werden können. Da die Labordiagnose des Buruli-Ulkus mit der der Tuberkulose vergleichbar ist, wurden die bestehenden Grundlagen der Tuberkulose-Diagnostik-Qualitätskontrolle angewandt.

Da eine derartige Untersuchung erstmalig durchgeführt wurde und aus diesem Grund keine Basis-Daten verfügbar waren, wurden alle Mikroskopie- und PCR-Proben untersucht, und nicht nur ein repräsentativer Teil der Proben ausgewählt.

Bei der Untersuchung der Proben durch Mikroskopie fiel zunächst die relativ große Anzahl der falsch-positiven und falsch-negativen Proben auf, also die Proben, die nach der 1. Untersuchung durch das Test-Labor zu wiederholen waren. Nachdem jedoch während der Wiederholung das Laborpersonal individuell trainiert wurde, konnten nach der 2. Untersuchung dieser Proben die meisten Fehler ausgeräumt werden. Durch die Supervision wurden die häufigsten Untersuchungsfehler erst deutlich, nämlich z.B. die Verwendung von ungefilterten Färbelösungen, die zu Aggregaten oder Kristallbildung führten, oder die Untersuchung von weniger als 100 Gesichtsfeldern. Durch die Wiederholung einzelner Proben konnte gezeigt werden, dass Training die Fähigkeiten des Laborpersonals deutlich steigern kann.

Bei der PCR könnte die relativ hohe Anzahl an falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen des Test-Labors dadurch erklärt werden, dass im Gegensatz zur Mikroskopie, bei der die Untersuchung beider Labore am selben Präparat erfolgte, bei der PCR zwei unterschiedliche Proben verwendet wurden. Wie beschrieben wurden durch die Standardisierung der Probenentnahme die Ergebnisse zwar verbessert, aber eine Übereinstimmung von 100 % erscheint aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Proben trotzdem nicht erreichbar zu sein. Auch bei Gewebeproben, deren Abnahmestellen direkt nebeneinander lagen, kann daher nicht garantiert werden, dass die Proben hinsichtlich Qualität und Beschaffenheit völlig gleichwertig sind. Aus diesem Grund sollten zukünftige EQA-Maßnahmen zur PCR besser an identischem Probenmaterial durchgeführt werden, was z.B. durch die Verwendung der identischen DNA-Extrakte realisiert werden könnte. Zudem erscheint es möglich, dass sehr schwach positive Proben, wie schon für die Abstrichproben beschrieben, aufgrund der geringen Menge detektierbarer DNA in wiederholten Tests variable Ergebnisse erzielen können.

Analog zur Mikroskopie konnte ein Großteil der falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnisse durch die Wiederholung der Untersuchung unter Supervision ausgeräumt werden. Im Hinblick auf methodische Überlegungen ist es jedoch schwierig zu beurteilen, ob die revidierten Ergebnisse ein Resultat der *Intra-Assay*-Variabilität der PCR-Methoden oder ein Ergebnis des Trainings darstellen. Trotzdem erscheint regelmäßiges Training des Laborpersonals essentiell zur Detektion von Faktoren, die die diagnostischen Ergebnisse negativ beeinflussen können. Zum Beispiel könnte die schwache Auflösung des Geldokumentationssystems des Test-Labors zur Über- oder Fehlinterpretation einiger fraglicher Gelbanden geführt haben. Diese Fehlerquelle konnte durch Training eliminiert werden.

5.1.3 Untersuchung der Ausbreitung von *M. ulcerans* in die angrenzende Umgebung des Geschwürs

Die chirurgische Behandlung des Buruli-Ulkus gilt heute immer noch als die wirksamste therapeutische Maßnahme. Um die Infektion zu entfernen, werden großflächige Exzisionen durchgeführt, die das komplette nekrotische und das subkutane Fettgewebe bis zur Faszie beeinhaltend und gleichzeitig weit in das makroskopisch gesund aussehende, an die Läsion angrenzende Gewebe ausgedehnt werden. Standards zur Definition der Exzisionslinie bestehen nicht, die Ausdehnung wird allein durch die subjektive Einschätzung des Chirurgen bestimmt (7, 38, 48, 88).

Um einerseits die Progression der Infektion vom Zentrum zur Peripherie der Läsionen nachzuvollziehen und andererseits die Exzisionsränder einer genaueren Untersuchung unterziehen zu können, wurde das Exzisionsmaterial von 20 Buruli-Ulkus-Patienten analysiert. Zu erwarten war ein positiver Befund im Zentrum der Läsionen, der durch Histopathologie semi-quantitativ bestimmt werden sollte. Es wurde weiterhin erwartet, dass die Anzahl der Bakterien zur Peripherie des Exzisionsmaterials abnimmt und im Randbereich keine Anzeichen einer Buruli-Ulkus-Infektion mehr nachzuweisen sind. Die tatsächlichen Ergebnisse waren überraschend. In nahezu allen untersuchten Gradientensegmenten wurde durch PCR und Histopathologie gleichermaßen eine *M. ulcerans*-Infektion nachgewiesen. Dabei nahm die Quantität der Bakterien zwar meist vom zentralen Segment zur Peripherie ab trotzdem wurden in 100 % der histopathologisch untersuchten, und in 85 % der durch PCR untersuchten peripheren Gradientensegmente Zeichen einer *M. ulcerans*-Infektion nachgewiesen. Auch die Untersuchung der Exzisionsränder mittels PCR zeigte in der Mehrheit der Fälle positive Ergebnisse für die kompletten Exzisionsränder bzw. alle untersuchten Proben. In allen Fällen gingen die Chirurgen davon aus, dass die weite Exzision kurativ war. Dies scheint aufgrund der Laborergebnisse nun in Frage gestellt zu sein, denn das oberflächlich gesunde Erscheinungsbild des Gewebes korreliert offensichtlich nicht mit der Dissemination der Bakterien in der Subkutis. Eine verlässliche Bestimmung der Exzisionsränder zu kurativen Zwecken, also dem vollständigen Entfernen allen infizierten Gewebes, scheint daher optisch nicht möglich zu sein.

Man muss allerdings anfügen, dass die klinische Relevanz dieser Ergebnisse noch überprüft werden muss. Trotz der Laborergebnisse waren innerhalb der Hospitalisierungsphase der Patienten (durchschnittlich zwei Monate) keine lokalen Rezidive zu vermerken. Zur Korrelation des Vorhandenseins von *M. ulcerans* im Randbereich der Exzision und dem Auftreten von Lokalrückfällen müsste eine Langzeitüberwachungsstudie durchgeführt

werden. Außerdem wurde im Rahmen dieser Studie die Bakterienlast durch die histopathologische Untersuchung nur semi-quantitativ beurteilt. Aufgrund des Vorhandenseins von AFB konnte dabei nicht zwischen toten und lebendigen Bakterien unterschieden werden. Durch PCR war der Nachweis der Bakterien qualitativ möglich. Auch hierbei konnte nicht zwischen toten und lebensfähigen Bakterien unterschieden werden. Es bleibt also offen, ob aufgrund von nachgewiesenen Bakterien die Gefahr von Rezidiven besteht oder ob möglicherweise eine bakterielle Mindestkonzentration existiert, die zur Ausbildung von Rezidiven nötig ist. Im ersten Fall könnte eine direkte Vorort-Untersuchung des exzidierten Gewebes sofort nach der Operation klären, ob sämtliches bakterienhaltiges Gewebe entfernt wurde oder die Exzision weiter ausgedehnt werden muss. Weiterhin wäre eine präoperative Untersuchung von Punch-Biopsien im Bereich der geplanten Exzisionslinie denkbar, um die klinische Bestimmung der nötigen Exzisionsweite durch Laborwerte zu unterstützen.

5.2 Vergleich mit anderen Untersuchungen

5.2.1 Entwicklung, Validierung und Etablierung einer an tropische Bedingungen adaptierten PCR zum Nachweis von *M. ulcerans*

Die derzeitige konventionelle PCR-Methode zur Detektion von *M. ulcerans* in Patientenproben wurde 1999 von Stinear *et al.* beschrieben (72). Sie wird neben anderen diagnostischen Verfahren wie Mikroskopie, Kultur und Histopathologie zur Laborbestätigung klinischer Verdachtsfälle von der WHO empfohlen (87).

Eine auf der *Real-time*-PCR-Technik beruhende Weiterentwicklung dieser PCR, mit deren Hilfe sogar der Bakteriengehalt in Patientenproben quantifiziert werden kann, wurde 2004 von Rondini *et al.* veröffentlicht (63). Beide Methoden, insbesondere aber der *Real-Time*-PCR-Ansatz, sind aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten in Endemiegebieten nicht oder nur schwer durchzuführen. Ein verlässlicher serologischer Test zur Diagnose der Buruli-Ulkus-Erkrankung ist derzeit nicht verfügbar.

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebene DRB-PCR stellt daher erstmalig eine an tropische Bedingungen angepasste PCR-Methode zum sensitiven Nachweis des Buruli-Ulkus dar.

5.2.2 Durchführung einer vergleichenden Studie aller zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden zum Nachweis von *M. ulcerans*

Nur wenige Veröffentlichungen beschäftigen sich mit dem Vergleich diagnostischer Methoden zur Detektion des Buruli-Ulkus. Die jüngsten, aussagekräftigsten Publikationen

stammen von Phillips *et al.*, Sizaire *et al.* und Portaels (Kongress-Vortrag) (59, 60, 67).

Sizaire *et al.* vergleichen die verschiedenen derzeit zur Verfügung stehenden Diagnostikmethoden. Die Autoren vermuten eine Sensitivität der Mikroskopie von 40 - 80 %, die Sensitivität der Kultur wird mit 20 - 60 % angenommen, für Histopathologie und PCR wird eine Sensitivität von > 90 % diskutiert. Kulturergebnisse werden in dieser Arbeit aufgrund der langen Generationszeit der Bakterien zur Diagnosestellung für ungeeignet befunden. Sizaire *et al.* beschreiben zwar die Überlegenheit der PCR gegenüber der Mikroskopie im Hinblick auf die Sensitivität, diskutieren aber auch die technischen Schwierigkeiten der Diagnosestellung im Feld. Die Autoren beschreiben daher die Mikroskopie als einzige einfach im Feld zu implementierende Methode, fügen aber auch an, dass die im Rahmen dieser Dissertation entwickelte und kürzlich veröffentlichte DRB-PCR diese Schwierigkeiten aufgrund der vereinfachten Anwendung überwinden könnte.

Portaels verglich ebenfalls Mikroskopie, Kultur, PCR und Histopathologie zur Diagnose des Buruli-Ulkus. Sie fand, dass PCR und Histopathologie die besten Methoden sind, um Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle zu bestätigen. Nur durch PCR und Histopathologie konnten gemäß ihrer Daten verlässliche Befunde unabhängig von der klinischen Erscheinungsform der Erkrankung gewonnen werden. Auch Portaels beschrieb die Sensitivität der Mikroskopie mit höchstens 45 %, während sie Sensitivitäten für Histopathologie und PCR von > 90 % anführt. Bei der Auswertung dieser Daten bestand das Gesamtkollektiv aus Patienten, die durch mindestens zwei Methoden laborbestätigt wurden, nicht wie im Rahmen dieser Arbeit aus allen klinisch diagnostizierten Fällen. So sind die leichten Abweichungen der Sensitivitäten der PCR zu erklären.

Phillips *et al.* beschrieben die Sensitivität der Mikroskopie mit 40 %, die der Kultur mit 35 - 50 % und die der Histopathologie mit 63 - 90 %. Die von den Autoren geringfügig modifizierte Standard-PCR erreicht gemäß ihrer Daten eine Sensitivität von 98 %. Auch in dieser Arbeit bestand das Patientenkollektiv jedoch nicht aus allen klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus-Fällen. Vielmehr wurden nur diejenigen Patienten in die Studie eingeschlossen, die definitiv durch Histopathologie bestätigt werden konnten oder entweder ein positives Kulturergebnis oder ein positives Mikroskopieergebnis in Verbindung mit einem fraglich positiven Histopathologieergebnis aufwiesen. Aufgrund der Unterschiede der Kollektive sind die enorm hohen Sensitivitätsraten der Studie von Phillips *et al.* zu erklären.

Phillips *et al.* diskutieren ebenfalls die Möglichkeit einer stufenweise durchgeführten Diagnostik. Hinsichtlich der Kostenersparnis schlagen sie auch als ersten Schritt die Mikroskopie vor, nur die negativen Fälle sollten einer PCR-Untersuchung unterzogen werden.

Die Autoren bezweifeln allerdings die Durchführbarkeit der Punch-Biopsie-Abnahme zur präoperativen Diagnosestellung. Dabei bietet sich die Untersuchung von präoperativ entnommenen Punch-Biopsien besonders im Rahmen der Kulturdiagnostik an, bei der die Entnahme von Proben vor der Behandlung aufgrund der im Rahmen dieser Dissertation erhaltenen Daten essentiell erscheint.

5.2.3 Untersuchung der Ausbreitung von *M. ulcerans* in die angrenzende Umgebung des Geschwürs

Wenige Publikationen beschäftigen sich mit chirurgischen Techniken zur Therapie des Buruli-Ulkus (39, 55-57). Es wird eine weiträumige Exzision der Läsion, inklusive des kompletten nekrotischen Gewebes und des betroffenen subkutanen adipösen Fettgewebes bis zur Faszie empfohlen. Die Exzision wird zur Reduktion des Rezidivrisikos bis in das makroskopisch gesund erscheinende Gewebe ausgedehnt (17, 82, 88).

Drei Kontrollstudien, die das Wiederauftreten und Nichtverheilen der Wunden nach Hauttransplantationen behandeln, wurden kürzlich veröffentlicht (2, 33, 73). Amofah *et al.* berichten von 50 behandelten prä-ulzerative Läsionen aus Ghana, bei denen innerhalb eines Jahres in 16 % der Fälle klinische Rezidive auftraten. Die Exzision wurde in Lokalanästhesie mit anschließender primärer Wundversorgung durch Wundverschluss durchgeführt. Die Rezidive werden von den Autoren auf Wundheilungsstörungen und die chirurgische Technik zurückgeführt. Einschränkend ist zu vermerken, dass weder die Erstdiagnose noch klinische Rezidive in dieser Studie labordiagnostisch gesichert wurden.

Teelken *et al.* (73) vergleichen den chirurgischen Erfolg nach Exzisionen von Ulzera zwischen zwei verschiedenen Krankenhäusern in Ghana. Im ersten Krankenhaus wurden großflächige Exzisionen durchgeführt, während im zweiten Krankenhaus die chirurgische Standardbehandlung näher am Rand der Läsion erfolgte. Während des ersten Jahres nach der Operation wurden 18 % (großflächige Exzision) bzw. 47 % (Exzision näher am Rand der Läsion) nicht verheilte bzw. wieder aufgetretene Ulzera festgestellt.

Kanga *et al.* berichten von 11 - 32 % Rezidiven im ersten Jahr nach der Exzision von 346 Buruli-Ulkus-Fällen in drei verschiedenen Krankenhäusern der Elfenbeinküste (33). Die niedrigste Wiedererkrankungsrate wird auf die Erfahrung der Chirurgen zurückgeführt. Die Autoren diskutieren die Möglichkeit einer mykobakteriellen Infiltration in makroskopisch gesund aussehendes Gewebe als Erklärung für das Wiederkehren der Erkrankung.

Zwei Punkte erscheinen für den Erfolg der chirurgischen Behandlung wichtig: Erstens ist eine schmerzfreie und trotzdem weiträumige Exzision, besonders bei Kindern, nur unter

Verwendung von General-, Spinal- oder regionaler Anästhesie durchführbar. Durch Lokalanästhesie, die häufig bei prä-ulzerativen Fällen eingesetzt wird, kann oft die gewünschte Exzisionsweite nicht erreicht werden. Außerdem kann die lokale Injektion von flüssigen Anästhetika die periphere Diffusion von AFB in angrenzendes subkutanes Fettgewebe unterstützen. Weiterhin besteht aus chirurgischer Sicht die generelle Regel, septische Wunden durch das zeitweise Offenlegen der Haut und einer daran anschließenden sekundären Wundversorgung mit Hauttransplantation zu behandeln. Daher könnte die Lokalanästhesie mit sofortigem Verschließen der Wunde das Wiederkehren der Erkrankung begünstigen, wie von Amofah *et al.* beschrieben.

Zweitens scheint es, wie die beschriebenen Daten zeigen, auch bei Durchführung einer großflächigen Exzision weit in makroskopisch gesund aussehendes Gewebe nicht möglich zu sein, die mykobakterielle Infiltration visuell auszuschließen. Auch eine Exzision, die aus chirurgischer Sicht ausreichend erscheint, kann aufgrund unsichtbarer Progression der Bakterien möglicherweise nicht völlig kurativ sein. Eine kürzlich veröffentlichte quantitative *Real-Time-PCR* von Rondini *et al.* (63) könnte die Frage klären, ob eine Mindestmenge an Bakterien zur Entstehung von Rezidiven nötig ist. Allerdings kann auch diese PCR-Methode nicht zwischen lebenden und toten *M. ulcerans* unterscheiden.

5.3 Schlussfolgerungen

5.3.1 Entwicklung, Validierung und Etablierung einer an tropische Bedingungen adaptierten PCR zum Nachweis von *M. ulcerans*

1. Mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten DRB-PCR liegt zum ersten Mal eine spezifische diagnostische Labormethode zum Nachweis von *M. ulcerans* vor, die unter den in Endemiegebieten vorherrschenden schwierigen klimatischen und technischen Bedingungen verlässlich im Rahmen des täglichen Routinebetriebs durchzuführen ist.
2. Die DRB-PCR ist der Standard-PCR hinsichtlich Spezifität und analytischer Sensitivität gleichzusetzen.
3. Die DRB-PCR ist unabhängig von Strom und Kühlketten durchzuführen, alle verwendeten Reagenzien sind stabil bei Raumtemperatur lagerbar, tropische Bedingungen beeinträchtigen die Qualität der Ergebnisse nicht.
4. Die Durchführung der DRB-PCR ist einfach und auch für ungeübtes Laborpersonal möglich.
5. Die Materialkosten der DRB-PCR liegen pro Anwendung nur ca. 2 – 3 € höher als die konventioneller PCR-Methoden.
6. Allgemein scheint das Alter der Läsion Einfluss auf die diagnostische Sensitivität zu haben. Frühe Läsionen erscheinen geeigneter zur Laborbestätigung der klinischen Verdachtsfälle, während in älteren Erkrankungsstadien nur noch wenige Bakterien nachweisbar sind, was die PCR-Diagnostik erschwert.

5.3.2 Durchführung einer vergleichenden Studie aller zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden zum Nachweis von *M. ulcerans*

1. Die zu Beginn der Studie entwickelte standardisierte Studienlogistik stellte die optimale Probenqualität und damit die Vergleichbarkeit aller diagnostischen Tests sicher.
2. Insgesamt wurden in allen Behandlungszentren mehr ulzerative als prä-ulzerative Erkrankungsstadien gefunden.
3. Die höchste diagnostische Sensitivität der Mikroskopie wurde bei der Untersuchung der Abstriche gefunden. Diese eignet sich daher als nicht-invasiver, präoperativer erster Suchtest zur Laborbestätigung klinischer Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle.
4. Die geringe Kulturausbeute scheint auf die Vorbehandlung der Patienten mit Rifampicin zurückzugehen.

5. Die hohen Übereinstimmungsraten der durch PCR untersuchten Abstriche und Biopsien, die erreichten exzellenten diagnostischen Sensitivitäten bei der Untersuchung beider Untersuchungsmaterialien unter Verwendung der DRB-PCR und der Standard-PCR gleichermaßen empfehlen die PCR als sensitivste Testmethode zur Diagnostik des Buruli-Ulkus.
6. Die Methode der PCR erscheint ca. doppelt so sensitiv wie die Mikroskopie.
7. Die Anwendung der derzeit bestehenden WHO-Empfehlungen zur gesicherten Diagnose des Buruli-Ulkus erfordern zwei positive Labortests. Würde nur ein positiver Test als ausreichend angesehen, könnten 20 % mehr Verdachtsfälle bestätigt werden.
8. Eine schrittweise, nacheinander durchgeführte Diagnostik bei prä-ulzerativen Läsionen würde > 35 % positive Ergebnisse durch die Mikroskopie der Gewebeproben erzielen, durch PCR würde ein zusätzlicher diagnostischen Gewinn von bis zu 30 % erreicht werden. Bis zu 65 % der klinisch diagnostizierten Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle könnten auf diese Weise laborbestätigt werden.
9. Eine schrittweise nacheinander durchgeführte Diagnostik bei ulzerativen Läsionen würde bis zu 35 % positiver Ergebnisse durch die Mikroskopie der Abstriche erzielen, durch PCR der Abstriche würde ein zusätzlicher diagnostischer Gewinn von > 30 % erreicht. Bis zu 65 % der Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle könnten so durch nicht-invasive Probennahme laborbestätigt werden. Die postoperative mikroskopische Untersuchung von Biopsien würde einen zusätzlichen diagnostischen Gewinn von 6 % erbringen, eine zusätzliche PCR der Biopsien noch ca. 5 % zusätzlichen diagnostischen Gewinn.
10. Eine kombinierte, aus prä- und postoperativen Diagnostikmethoden bestehende stufenweise durchgeführte Diagnostik bei ulzerativen Läsionen könnte bis zu 75 % aller Buruli-Ulkus-Verdachtsfälle laborbestätigen.
11. Durch die externe Qualitätskontrolle mit Supervision und Training wurden die häufigsten Untersuchungsfehler deutlich und konnten ausgeräumt werden. Regelmäßiges Training des Laborpersonals erscheint essentiell zur Detektion von Faktoren, die die diagnostischen Ergebnisse negativ beeinflussen können.

5.3.3 Untersuchung der Ausbreitung von *M. ulcerans* in die angrenzende Umgebung des Geschwürs

1. Die auf der makroskopischen Beurteilung des Gewebes basierende Vermutung, dass die Exzisionsweite kurativ gewählt wurde, korreliert nicht mit der Dissemination der

Infektion. Richtlinien zur maximal nötigen und trotzdem kurativen Exzisionsweite konnten daher anhand des untersuchten Patientenkollektivs nicht erarbeitet werden.

2. Auch wenn die Konzentration der Bakterien vom Zentrum einer Buruli-Ulkus-Läsion zur Peripherie abnimmt, kann die verlässliche Bestimmung der Exzisionsränder, die zur Entfernung des gesamten infizierten Gewebes nötig ist, nicht allein visuell erfolgen.
3. Eine gerade durchgeführte Langzeitüberwachungs-Studie der untersuchten Patienten deutet an, dass eine in Kombination zur Chirurgie durchgeführte Antibiotikagabe, verbunden mit einer labordiagnostischen Untersuchung des Gewebes vor der Operation (bzw. nach der Operation zur Bestätigung der Exzisionsweite), zur Reduktion der Rezidivrate beitragen könnte.

6 Zusammenfassung

Die Buruli-Ulkus-Erkrankung stellt ein gravierendes Problem der öffentlichen Gesundheitsfürsorge in tropischen Ländern dar. Unbehandelt kann die Erkrankung zu Kontrakturen und durch Sekundärinfektionen sogar zum Tode führen. Kontrollstrategien betroffener Länder beschränken sich auf die Früherkennung und die chirurgische Behandlung klinisch diagnostizierter Fälle. Die Diagnostik des Buruli-Ulkus kann anhand des mikroskopischen Nachweises von AFB, der Kultivierung von *Mycobacterium ulcerans* und der PCR durch die Untersuchung von Abstrichen und Biopsien sowie der histopathologischen Untersuchung von Biopsien durchgeführt werden. Ein diagnostischer Gold-Standard zur Laborbestätigung klinischer Verdachtsfälle existiert nicht. Sensitive Diagnostikmethoden wie Histopathologie oder PCR sind in Endemiegebieten aufgrund technischer Schwierigkeiten oder dem Fehlen ausgebildeten Personals meist nicht verfügbar. Hervorgerufen durch die verzögerte Diagnosestellung, können ausgedehnte Behandlungskosten durch lange Krankenhausaufenthalte entstehen, die ein großes sozioökonomisches Problem der betroffenen Länder darstellen. Es werden daher dringend sensitive Labormethoden, wie die PCR, zur Bestätigung von Verdachtsfällen im frühen Krankheitsstadium benötigt, die zusätzlich noch verlässlich und einfach durchzuführen sind.

Allerdings wird die Durchführung konventioneller PCR-Techniken unter tropischen Bedingungen vor allem aufgrund des Klimas, der fehlenden Laborausstattung, unzuverlässiger Stromversorgung und den begrenzten finanziellen Möglichkeiten der Gesundheitssektoren der Endemiegebiete erschwert.

Die im Rahmen dieser Arbeit anhand der derzeit zur Diagnose der Buruli-Ulkus-Erkrankung verwendeten Standard-PCR-Methode entwickelte, auf Trockenreagenzien basierende, DRB-PCR ist aufgrund ihrer vereinfachten Handhabung perfekt an tropische Bedingungen und die dort vorherrschenden schwierigen klimatischen und technischen Begebenheiten angepasst: Zur Durchführung der DRB-PCR werden keine Kühl- und Gefriergeräte oder Generatoren zur Stabilisierung der Stromversorgung benötigt, da alle Reagenzien bei Raumtemperatur gelagert werden können. Die Qualität der Reagenzien ist stets vergleichbar, da sie nicht, wie gefroren gelagerte PCR-Reagenzien, durch die in tropischen Ländern üblicherweise vorherrschende unzuverlässige Stromversorgung häufigen Auf- und Abtauprozessen unterliegen. Weiterhin ist das Kontaminationsrisiko gegenüber der Standard-PCR bedeutend vermindert, da außer den lyophyllisierten Primern nur die „*PuReTaq Ready-To-Go-PCR-Beads*“ und die DNA

zugegeben werden muss. Die Materialkosten der DRB-PCR betragen nur ca. 2 – 3 € mehr als die herkömmlicher PCR-Methoden.

Es konnte gezeigt werden, dass die DRB-PCR hinsichtlich Sensitivität und Spezifität der Standard-PCR zum Nachweis von *M. ulcerans* gleichzusetzen ist. Die DRB-PCR bietet sich daher zukünftig zur Routineanwendung in Laboren tropischer Endemiegebiete an. Zur Gewährleistung verlässlicher Ergebnisse ist allerdings optimale Qualität und Beschaffenheit des Untersuchungsmaterials essentiell. Allgemein scheint das Alter der Läsion einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die diagnostische Sensitivität der DRB-PCR zu besitzen: Die Untersuchung früher Läsionstypen ist offensichtlich zur Laborbestätigung klinischer Verdachtsfälle geeigneter als ältere Erkrankungsstadien, bei denen teilweise nur noch wenige Bakterien nachweisbar sind.

Im Vergleich mit anderen Diagnostikmethoden erscheint die DRB-PCR als sensitivste vor Ort durchführbare Methode geeignet zur Laborbestätigung von Buruli-Ulkus-Verdachtsfällen: Die in dieser Studie ermittelte diagnostische Sensitivität der Mikroskopie betrug bis zu 40 %, die diagnostische Sensitivität der Kultur ist aufgrund der Vorbehandlung der meisten Patienten mit antimykobakteriellen Medikamenten im Studiengebiet nicht repräsentativ. Außerdem erscheint die Kultur aufgrund der langen Generationszeit von *M. ulcerans* als diagnostische Methode ungeeignet. Durch die DRB-PCR konnte eine diagnostische Sensitivität von bis zu 75 % erreicht werden, die diagnostische Sensitivität der Standard-PCR lag mit ca. 80,0 % nur geringfügig höher. Die *Inter-Assay*-Übereinstimmungsrate zwischen DRB-PCR und Standard-PCR betrug, abhängig vom Untersuchungsmaterial, > 96 %. Die Ergebnisse der Histopathologie stehen in Endemiegebieten nicht zeitnah zur Verfügung, so dass sich diese Methode lediglich als Referenzmethode bzw. zur Differentialdiagnosestellung eignet.

Gemäß bestehenden WHO-Empfehlungen werden derzeit zwei positive Laborergebnisse zur gesicherten Diagnose des Buruli-Ulkus benötigt. Würde nur ein positiver Test als ausreichend angesehen, könnten anhand der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten 20 % mehr Verdachtsfälle bestätigt werden. Da strukturelle, technische und finanzielle Beschränkungen eine umfassende Labordiagnose in Endemiegebieten erschweren, erscheint es daher sinnvoll, die bestehenden Empfehlungen zu überdenken. Vor dem Hintergrund der Kosten- und Zeitersparnis wäre eine nacheinander erfolgende Stufendiagnostik, beginnend mit weniger sensitiven Nachweismethoden, wie z. B. der Mikroskopie, gefolgt von der Untersuchung der mikroskopisch negativen Proben durch hochsensitive Diagnostikmethoden wie DRB-PCR denkbar. Bei prä-ulzerativen Läsionen würden so > 35 % aller Verdachtsfälle schon allein

durch die Mikroskopie bestätigt, durch die DRB-PCR würden noch weitere fast 30 % der Verdachtsfälle bestätigt. Im Falle ulzerativer Läsionen würden präoperativ und nicht-invasiv durch Untersuchung der Abstriche durch Mikroskopie bis zu 35 % der klinischen Verdachtsfälle laborbestätigt, durch anschließende DRB-PCR würden zusätzlich > 30 % gefunden. Postoperativ könnten durch Mikroskopie und PCR der Biopsien weitere 6 % bzw. 5 % der Verdachtsfälle bestätigt werden. Dieser relativ niedrige zusätzliche diagnostische Gewinn ist jedoch in Verbindung mit dem hohen Laboraufwand und den entstehenden Kosten kritisch abzuwägen.

Die Daten dieser Arbeit legen nahe, dass Supervision und unterstützendes, regelmäßiges Training des Laborpersonals zur Aufklärung von Faktoren wichtig ist, die die Durchführung und Auswertung diagnostischer Verfahren negativ beeinflussen könnten. Begleitend zur Labordiagnostik durchgeführte EQA-Maßnahmen erscheinen daher essentiell, um die Qualität der Ergebnisse sicherzustellen.

Die Qualität der Ergebnisse ist beispielsweise bei der zukünftig denkbaren, vor der Operation durchzuführenden, laborbestätigten Bestimmung der Exzisionsausdehnung von entscheidender Bedeutung. Es war im Rahmen der Studie nicht möglich, visuell eine bakterienfreie Exzisionsweite zu bestimmen. Obwohl die Bakterienkonzentration vom Läsionszentrum zur Peripherie abnimmt, kann makroskopisch gesund erscheinendes, an eine Buruli-Ulkus-Läsion angrenzendes Gewebe *M. ulcerans* enthalten. Rezidive ließen sich möglicherweise durch die Gabe von antimykobakteriellen Medikamenten, kombiniert mit einer vor der Operation durchgeführten laborunterstützten Bestimmung von bakterienfreien Schnittträgern, vermindern.

7 Literaturverzeichnis

1. **Alsop, D. G.** 1972. The bairnsdale ulcer. *Aust N Z J Surg* **41**:317-9.
2. **Amofah, G., S. Asamoah, and C. Afram-Gyening.** 1998. Effectiveness of excision of pre-ulcerative Buruli lesions in field situations in a rural district in Ghana. *Trop Doct* **28**:81-3.
3. **Amofah, G., F. Bonsu, C. Tetteh, J. Okrah, K. Asamoah, K. Asiedu, and J. Addy.** 2002. Buruli ulcer in Ghana: results of a national case search. *Emerg Infect Dis* **8**:167-70.
4. **Anonymous.** 1969. BCG vaccination against *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer). First results of a trial in Uganda. *Lancet* **1**:111-5.
5. **Anonymous.** 2003. Buruli ulcer disease. *Mycobacterium ulcerans* infection. *Wkly Epidemiol Rec* **78**:163-8.
6. **Anonymous.** 2006. Horten-Zentrum für praxisorientierte Forschung und Wissenstransfer. www.evimed.ch/glossar/lr.html
7. **Asiedu, K., and S. Etuaful.** 1998. Socioeconomic implications of Buruli ulcer in Ghana: a three-year review. *Am J Trop Med Hyg* **59**:1015-22.
8. **Bafende, A. E., M. D. Phanzu, and B. B. Imposo.** 2004. Buruli ulcer in the Democratic Republic of Congo: epidemiology, presentation and outcome. *Trop Doct* **34**:82-4.
9. **Bar, W., S. Rusch-Gerdes, E. Richter, G. Marquez de Bar, C. Dittmer, H. Papsdorf, P. Stosiek, P. B. de Rijk, W. M. Meyers, and F. Portaels.** 1998. *Mycobacterium ulcerans* infection in a child from Angola: diagnosis by direct detection and culture. *Trop Med Int Health* **3**:189-96.
10. **Barker, D. J.** 1971. Buruli disease in a district of Uganda. *J Trop Med Hyg* **74**:260-4.
11. **Barnetson, R. S.** 1993. Skin diseases in the tropics. *Med J Aust* **159**:321-5.
12. **Bartralot, R., V. Garcia-Patos, D. Sitjas, L. Rodriguez-Cano, J. Mollet, N. Martin-Casabona, P. Coll, A. Castells, and R. M. Pujol.** 2005. Clinical patterns of cutaneous nontuberculous mycobacterial infections. *Br J Dermatol* **152**:727-34.
13. **Burchard, G. D., and M. Bierther.** 1986. Buruli ulcer: clinical pathological study of 23 patients in Lambarene, Gabon. *Trop Med Parasitol* **37**:1-8.
14. **Cadapan, L. D., R. L. Arslanian, J. R. Carney, S. M. Zavala, P. L. Small, and P. Licari.** 2001. Suspension cultivation of *Mycobacterium ulcerans* for the production of mycolactones. *FEMS Microbiol Lett* **205**:385-9.
15. **Chemlal, K., K. De Ridder, P. A. Fonteyne, W. M. Meyers, J. Swings, and F. Portaels.** 2001. The use of IS2404 restriction fragment length polymorphisms suggests the diversity of *Mycobacterium ulcerans* from different geographical areas. *Am J Trop Med Hyg* **64**:270-3.
16. **Clancey, J. K.** 1964. Mycobacterial Skin Ulcers In Uganda: Description Of A New Mycobacterium (*Mycobacterium Buruli*). *J Pathol Bacteriol* **88**:175-87.
17. **Cornet, L., M. Richard-Kadio, H. A. N'Guessan, P. Yapo, H. Hossoko, R. Dick, and J. M. Casanelli.** 1992. [Treatment of Buruli's ulcers by excision-graft]. *Bull Soc Pathol Exot* **85**:355-8.
18. **Darje, H.** 2003. [*Mycobacterium ulcerans* infection: epidemiological, clinical and therapeutical aspects]. *Bull Soc Pathol Exot* **96**:368-71.
19. **Debacker, M., J. Aguiar, C. Steunou, C. Zinsou, W. M. Meyers, A. Guedenon, J. T. Scott, M. Dramaix, and F. Portaels.** 2004. *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer) in rural hospital, Southern Benin, 1997-2001. *Emerg Infect Dis* **10**:1391-8.
20. **Debacker, M., J. Aguiar, C. Steunou, C. Zinsou, W. M. Meyers, and F. Portaels.** 2005. Buruli ulcer recurrence, Benin. *Emerg Infect Dis* **11**:584-9.

21. **Dega, H., O. Chosidow, S. Barete, B. Carbonnelle, J. Grosset, and V. Jarlier.** 2000. [*Mycobacterium ulcerans* infection]. *Ann Med Interne (Paris)* **151**:339-44.
22. **Dobos, K. M., P. L. Small, M. Deslauriers, F. D. Quinn, and C. H. King.** 2001. *Mycobacterium ulcerans* cytotoxicity in an adipose cell model. *Infect Immun* **69**:7182-6.
23. **Dodge, O. G., and H. F. Lunn.** 1962. Buruli ulcer: a mycobacterial skin ulcer in a Uganda child. *J Trop Med Hyg* **65**:139-42.
24. **Etuaful, S., B. Carbonnelle, J. Grosset, S. Lucas, C. Horsfield, R. Phillips, M. Evans, D. Ofori-Adjei, E. Klutse, J. Owusu-Boateng, G. K. Amedofu, P. Awuah, E. Ampadu, G. Amofah, K. Asiedu, and M. Wansbrough-Jones.** 2005. Efficacy of the combination rifampin-streptomycin in preventing growth of *Mycobacterium ulcerans* in early lesions of Buruli ulcer in humans. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3182-6.
25. **Faber, W. R.** 2005. Life-threatening mycobacteria infection. *Clin Dermatol* **23**:254-7.
26. **Faber, W. R., L. M. Arias-Bouda, J. E. Zeegelaar, A. H. Kolk, P. A. Fonteyne, J. Toonstra, and F. Portaels.** 2000. First reported case of *Mycobacterium ulcerans* infection in a patient from China. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **94**:277-9.
27. **George, K. M., L. P. Barker, D. M. Welty, and P. L. Small.** 1998. Partial purification and characterization of biological effects of a lipid toxin produced by *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun* **66**:587-93.
28. **George, K. M., D. Chatterjee, G. Gunawardana, D. Welty, J. Hayman, R. Lee, and P. L. Small.** 1999. Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Science* **283**:854-7.
29. **George, K. M., L. Pascopella, D. M. Welty, and P. L. Small.** 2000. A *Mycobacterium ulcerans* toxin, mycolactone, causes apoptosis in guinea pig ulcers and tissue culture cells. *Infect Immun* **68**:877-83.
30. **Guarner, J., J. Bartlett, E. A. Whitney, P. L. Raghunathan, Y. Stienstra, K. Asamoah, S. Etuaful, E. Klutse, E. Quarshie, T. S. van der Werf, W. T. van der Graaf, C. H. King, and D. A. Ashford.** 2003. Histopathologic features of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Emerg Infect Dis* **9**:651-656.
31. **Hayman, J.** 1987. The discovery of the Bairnsdale ulcer and the source of the Nile. *Occas Pap Med Hist Aust* **3**:71-7.
32. **Johnson, R. C., M. Makoutode, G. E. Sopoh, P. Elsen, J. Gbovi, L. H. Pouteau, W. M. Meyers, M. Boko, and F. Portaels.** 2005. Buruli ulcer distribution in Benin. *Emerg Infect Dis* **11**:500-1.
33. **Kanga, J. M., D. E. Kacou, A. Sangare, Y. Dabila, N. H. Asse, and S. Djakeaux.** 2003. [Recurrence cases observed after surgical treatment of Buruli ulcer in Cote d'Ivoire]. *Bull Soc Pathol Exot* **96**:406-9.
34. **Kanga, J. M., E. D. Kacou, K. Kouame, E. Kassi, M. Kaloga, J. K. Yao, M. Dion-Laine, L. E. Avoaka, P. Yoboue-Yao, A. Sangare, J. E. Ecra, C. Ahogo, M. S. Djedje, A. J. Kadiri, and C. Aye.** 2004. [Buruli ulcer: epidemiological, clinical and therapeutic aspects in the Ivory Coast]. *Med Trop (Mars)* **64**:238-42.
35. **Kibadi, K.** 2005. [*Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer): surgical treatment of 102 cases in the Democratic Republic of Congo]. *Med Trop (Mars)* **65**:444-8.
36. **Kibadi, K., M. Tsakala, J. B. Mputu-Yamba, T. Muyembe, M. Kashongwe, B. Imposso, and A. Nsiala.** 2003. [Buruli ulcer in Angolese refugees in the Kimpese area, Lower Congo, D.R. Congo]. *Sante* **13**:39-41.
37. **Kieninger, G., G. E. Schubert, and U. Ullmann.** 1972. [The Buruli ulcer]. *Z Tropenmed Parasitol* **23**:342-53.

38. **King, C. H., Ashford, D. A., Dobos K., Whitney E. A. S., Raghunathan P. L., Guarner J., Tappero J. W.** 2001. *Mycobacterium ulcerans* infection and Buruli ulcer disease: Emergence of a public health dilemma. ASM press, Washington DC.
39. **Knipper, P., R. Zilliox, C. Johnson, and P. Antoine.** 2004. [Buruli disease and plastic surgery]. *Ann Chir Plast Esthet* **49**:265-72.
40. **Köhler, W., H. J. Eggers, B. Fleischer, R. Marre, H. Pfister, and G. Pulverer.** 2001. *Medizinische Mikrobiologie*, vol. 8., völlig neu bearbeitete Auflage. Urban & Fischer, München, Jena.
41. **Lagarrigue, V., F. Portaels, W. M. Meyers, and J. Aguiar.** 2000. [Buruli ulcer: risk of bone involvement! Apropos of 33 cases observed in Benin]. *Med Trop (Mars)* **60**:262-6.
42. **Liu, J., C. E. Barry, 3rd, G. S. Besra, and H. Nikaido.** 1996. Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J Biol Chem* **271**:29545-51.
43. **MacCallum, O., J. C. Tolhurst, G. Buckle, and H. A. Sissons.** 1948. A new mycobacterial infection in man. *J. Pathol. Bacteriol*:90-122.
44. **Marsollier, L., G. Prevot, N. Honore, P. Legras, A. L. Manceau, C. Payan, H. Kouakou, and B. Carbonnelle.** 2003. Susceptibility of *Mycobacterium ulcerans* to a combination of amikacin/rifampicin. *Int J Antimicrob Agents* **22**:562-6.
45. **Marsollier, L., R. Robert, J. Aubry, J. P. Saint Andre, H. Kouakou, P. Legras, A. L. Manceau, C. Mahaza, and B. Carbonnelle.** 2002. Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol* **68**:4623-8.
46. **Marston, B. J., M. O. Diallo, C. R. Horsburgh, Jr., I. Diomande, M. Z. Saki, J. M. Kanga, G. Patrice, H. B. Lipman, S. M. Ostroff, and R. C. Good.** 1995. Emergence of Buruli ulcer disease in the Daloa region of Cote d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg* **52**:219-24.
47. **Meyers, M. W.** 1995. *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer), 2nd edition ed. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
48. **Meyers, W. M., N. Tignokpa, G. B. Priuli, and F. Portaels.** 1996. *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer): first reported patients in Togo. *Br J Dermatol* **134**:1116-21.
49. **Mitchell, P. J., I. V. Jerrett, and K. J. Slee.** 1984. Skin ulcers caused by *Mycobacterium ulcerans* in koalas near Bairnsdale, Australia. *Pathology* **16**:256-60.
50. **Monson, M. H., D. W. Gibson, D. H. Connor, R. Kappes, and H. A. Hienz.** 1984. *Mycobacterium ulcerans* in Liberia: a clinicopathologic study of 6 patients with Buruli ulcer. *Acta Trop* **41**:165-72.
51. **Mullis, K. B., and F. A. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**:335-50.
52. **Mve-Obiang, A., R. E. Lee, F. Portaels, and P. L. Small.** 2003. Heterogeneity of mycolactones produced by clinical isolates of *Mycobacterium ulcerans*: implications for virulence. *Infect Immun* **71**:774-83.
53. **Noeske, J., C. Kuaban, S. Rondini, P. Sorlin, L. Ciaffi, J. Mbuagbaw, F. Portaels, and G. Pluschke.** 2004. Buruli ulcer disease in Cameroon rediscovered. *Am J Trop Med Hyg* **70**:520-6.
54. **Oluwasanmi, J. O., T. F. Solankee, E. O. Olurin, S. O. Itayemi, G. O. Alabi, and A. O. Lucas.** 1976. *Mycobacterium ulcerans* (Buruli) skin ulceration in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* **25**:122-8.
55. **Ouattara, D., J. P. Meningaud, L. Kaba, A. Sica, and H. Asse.** 2003. [Plastic surgery treatment of Buruli ulcer sequelae. A retrospective study of 16 patients]. *Ann Chir Plast Esthet* **48**:13-9.
56. **Ouattara, D., J. P. Meningaud, L. Kaba, A. Sica, and H. Asse.** 2004. [Treatment of Buruli ulcer disease by excision and skin graft]. *Ann Chir Plast Esthet* **49**:11-6.

57. **Ouattara, D., J. P. Meningaud, and F. Saliba.** 2002. [Multifocal forms of Buruli ulcer: clinical aspects and management difficulties in 11 cases]. *Bull Soc Pathol Exot* **95**:287-91.
58. **Ouoba, K., D. Sano, A. Traore, R. Ouedraogo, B. Sakande, and A. Sanou.** 1998. [Buruli ulcers in Burkina Faso: apropos of 6 cases]. *Tunis Med* **76**:46-50.
59. **Phillips, R., C. Horsfield, S. Kuijper, A. Lartey, I. Tetteh, S. Etuaful, B. Nyamekye, P. Awuah, K. M. Nyarko, F. Osei-Sarpong, S. Lucas, A. H. Kolk, and M. Wansbrough-Jones.** 2005. Sensitivity of PCR targeting the IS2404 insertion sequence of *Mycobacterium ulcerans* in an Assay using punch biopsy specimens for diagnosis of Buruli ulcer. *J Clin Microbiol* **43**:3650-6.
60. **Portaels, F.** 2006. Presented at the WHO annual meeting on Buruli ulcer 2006, 2006.
61. **Portaels, F., P. Elsen, A. Guimaraes-Peres, P. A. Fonteyne, and W. M. Meyers.** 1999. Insects in the transmission of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Lancet* **353**:986.
62. **Portaels, F., H. Traore, K. De Ridder, and W. M. Meyers.** 1998. In vitro susceptibility of *Mycobacterium ulcerans* to clarithromycin. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:2070-3.
63. **Rondini, S., E. Mensah-Quainoo, H. Troll, T. Bodmer, and G. Pluschke.** 2003. Development and application of real-time PCR assay for quantification of *Mycobacterium ulcerans* DNA. *J Clin Microbiol* **41**:4231-7.
64. **Sambrook, J., and D. Russel.** 2001. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
65. **Seevanayagam, S., and J. Hayman.** 1992. *Mycobacterium ulcerans* infection; is the "Bairnsdale ulcer" also a Ceylonese disease? *Ceylon Med J* **37**:125-7.
66. **Siegmund, V., O. Adjei, P. Racz, C. Berberich, E. Klutse, F. van Vloten, T. Kruppa, B. Fleischer, and G. Bretzel.** 2005. Dry-reagent-based PCR as a novel tool for laboratory confirmation of clinically diagnosed *Mycobacterium ulcerans*-associated disease in areas in the tropics where *M. ulcerans* is endemic. *J Clin Microbiol* **43**:271-6.
67. **Sizaire, V., F. Nackers, E. Comte, and F. Portaels.** 2006. *Mycobacterium ulcerans* infection: control, diagnosis, and treatment. *Lancet Infect Dis* **6**:288-96.
68. **Songne, B., B. Abete, M. Scotte, N. Tignokpa, P. Valenti, and K. L. Tchangai-Walla.** 2001. [Buruli ulcer in Togo: 21 cases]. *Presse Med* **30**:533.
69. **Stienstra, Y., W. T. van der Graaf, K. Asamoah, and T. S. van der Werf.** 2002. Beliefs and attitudes toward Buruli ulcer in Ghana. *Am J Trop Med Hyg* **67**:207-13.
70. **Stienstra, Y., M. H. van Roest, M. J. van Wezel, I. C. Wiersma, I. C. Hospers, P. U. Dijkstra, R. C. Johnson, E. O. Ampadu, J. Gbovi, C. Zinsou, S. Etuaful, E. Y. Klutse, W. T. van der Graaf, and T. S. van der Werf.** 2005. Factors associated with functional limitations and subsequent employment or schooling in Buruli ulcer patients. *Trop Med Int Health* **10**:1251-7.
71. **Stinear, T., J. K. Davies, G. A. Jenkin, J. A. Hayman, F. Oppedisano, and P. D. Johnson.** 2000. Identification of *Mycobacterium ulcerans* in the environment from regions in Southeast Australia in which it is endemic with sequence capture-PCR. *Appl Environ Microbiol* **66**:3206-13.
72. **Stinear, T., B. C. Ross, J. K. Davies, L. Marino, R. M. Robins-Browne, F. Oppedisano, A. Sievers, and P. D. Johnson.** 1999. Identification and characterization of IS2404 and IS2606: two distinct repeated sequences for detection of *Mycobacterium ulcerans* by PCR. *J Clin Microbiol* **37**:1018-23.
73. **Teelken, M. A., Y. Stienstra, D. E. Ellen, E. Quarshie, E. Klutse, W. T. van der Graaf, and T. S. van der Werf.** 2003. Buruli ulcer: differences in treatment outcome between two centres in Ghana. *Acta Trop* **88**:51-6.

74. **Thangaraj, H. S., O. Adjei, B. W. Allen, F. Portaels, M. R. Evans, D. K. Banerjee, and M. H. Wansbrough-Jones.** 2000. In vitro activity of ciprofloxacin, sparfloxacin, ofloxacin, amikacin and rifampicin against Ghanaian isolates of *Mycobacterium ulcerans*. *J Antimicrob Chemother* **45**:231-3.
75. **Ullmann, U., and P. Perrin.** 1970. The Lactose operon. In J. Beckeith and D. Zipser (ed.), vol. 143-172pp.
76. **Ullmann, U., G. E. Schubert, and G. Kieninger.** 1975. [Bacteriological investigations and animal experiments with *Mycobacterium ulcerans* (Tubingen 1971) (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol [Orig A]* **232**:318-27.
77. **van der Does, C. D.** 1968. [Buruli skin ulcers]. *Ned Tijdschr Geneesk* **112**:1292-4.
78. **van der Graaf, W. T., R. W. Scherpbier, and T. S. van der Werf.** 1999. [Buruli ulcer (*Mycobacterium ulcerans* infection); report from the International Congress in Yamoussoukro, Ivory Coast]. *Ned Tijdschr Geneesk* **143**:312-6.
79. **van der Werf, T. S., Y. Stienstra, R. C. Johnson, R. Phillips, O. Adjei, B. Fleischer, M. H. Wansbrough-Jones, P. D. Johnson, F. Portaels, W. T. van der Graaf, and K. Asiedu.** 2005. *Mycobacterium ulcerans* disease. *Bull World Health Organ* **83**:785-91.
80. **van der Werf, T. S., T. Stinear, Y. Stienstra, W. T. van der Graaf, and P. L. Small.** 2003. Mycolactones and *Mycobacterium ulcerans* disease. *Lancet* **362**:1062-4.
81. **van der Werf, T. S., and W. T. van der Graaf.** 1990. Buruli ulcer in West Africa. *Lancet* **336**:1440.
82. **van der Werf, T. S., W. T. van der Graaf, J. W. Tappero, and K. Asiedu.** 1999. *Mycobacterium ulcerans* infection. *Lancet* **354**:1013-8.
83. **Veitch, M. G., P. D. Johnson, P. E. Flood, D. E. Leslie, A. C. Street, and J. A. Hayman.** 1997. A large localized outbreak of *Mycobacterium ulcerans* infection on a temperate southern Australian island. *Epidemiol Infect* **119**:313-8.
84. **Ward, D. E.** 1970. Buruli ulcer. *Br Med J* **3**:346.
85. **WHO.** 2001. Buruli Ulcer - Management of *Mycobacterium ulcerans* disease. WHO, Geneva.
86. **WHO** 2006, posting date. Buruli ulcer endemic countries. [Online.]
87. **WHO.** 2001. Buruli ulcer. Diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* disease. WHO, Geneva.
88. **WHO.** 2000. Buruli ulcer. *Mycobacterium ulcerans* infection. WHO/CDS/CPE/GBUI, Geneva.
89. **WHO.** 2002. Buruli ulcer. *Mycobacterium ulcerans* infection. *Wkly Epidemiol Rec* **77**:165-6.
90. **WHO.** 2004. Provisional guidelines on the role of antibiotics in the management of *Mycobacterium ulcerans* disease (Draft). WHO, Geneva.
91. **Zabin, I.** 1979. beta-galactosidase and the lactose operon. *UCLA Forum Med Sci*:49-62.

8 Anhang

Stammbezeichnung	Spezies	Herkunftsland
ITM 97-610	<i>M. ulcerans</i>	Ghana
ITM 3129	<i>M. ulcerans</i>	Zaire
ITM 5114	<i>M. ulcerans</i>	Mexico
ITM 5147	<i>M. ulcerans</i>	Australien
ITM 8756	<i>M. ulcerans</i>	Japan
ITM 9146	<i>M. ulcerans</i>	Benin
ITM 94-511	<i>M. ulcerans</i>	Elfenbeinküste
ITM 98-912	<i>M. ulcerans</i>	China
ITM 97-680	<i>M. ulcerans</i>	Togo
ITM 96-657	<i>M. ulcerans</i>	Angola
ITM 94-1328	<i>M. ulcerans</i>	Malaysia
ITM 5156	<i>M. ulcerans</i>	Papua
QDRLMD 9807	<i>M. ulcerans</i>	Australien
QDRLMD 9808	<i>M. ulcerans</i>	Australien
QDRLMD 9819	<i>M. ulcerans</i>	Australien
QDRLMD 9820	<i>M. ulcerans</i>	Australien
QDRLMD 9885	<i>M. ulcerans</i>	Australien
QDRLMD 9920	<i>M. ulcerans</i>	Australien
QDRLMD 10128	<i>M. ulcerans</i>	Australien
QDRLMD 10137	<i>M. ulcerans</i>	Australien
QDRLMD 10166	<i>M. ulcerans</i>	Australien
QDRLMD 10463	<i>M. ulcerans</i>	Australien
KCCR 207	<i>M. ulcerans</i>	Ghana
KCCR 216	<i>M. ulcerans</i>	Ghana
KCCR 221	<i>M. ulcerans</i>	Ghana
KCCR 4	<i>M. ulcerans</i>	Ghana
KCCR 05	<i>M. ulcerans</i>	Ghana
KCCR 05 R / S	<i>M. ulcerans</i>	Ghana
KCCR 07	<i>M. ulcerans</i>	Ghana
KCCR 7	<i>M. ulcerans</i>	Ghana
KCCR 10	<i>M. ulcerans</i>	Ghana
KCCR 11	<i>M. ulcerans</i>	Ghana
KCCR 12	<i>M. ulcerans</i>	Ghana
KCCR13	<i>M. ulcerans</i>	Ghana
KCCR14	<i>M. ulcerans</i>	Ghana
KCCR19	<i>M. ulcerans</i>	Ghana
KCCR 21	<i>M. ulcerans</i>	Ghana
KCCR D1	<i>M. ulcerans</i>	Ghana
KCCR D3	<i>M. ulcerans</i>	Ghana
BNITM/M1	<i>M. marinum</i>	Deutschland
BNITM/M2	<i>M. lentiflavium</i>	Deutschland
BNITM/M3	<i>M. tuberculosis H₃₇Rv</i>	Deutschland
BNITM/M4	<i>M. avium</i>	Deutschland
BNITM/M5	<i>M. intracellulare</i>	Deutschland
BNITM/M6	<i>M. fortuitum</i>	Deutschland
BNITM/M7	<i>M. szulgai</i>	Deutschland
BNITM/M8	<i>M. xenopi</i>	Deutschland
BNITM/M9	<i>M. scrofulaceum</i>	Deutschland
BNITM/M10	<i>M. gordonae</i>	Deutschland
BNITM/M11	<i>M. kansasii</i>	Deutschland
BNITM/M12	<i>M. malmoense</i>	Deutschland
BNITM/M13	<i>M. chelonae</i>	Deutschland
BNITM/M14	<i>M. smegmatis</i>	Deutschland

Tabelle 33 Zur Etablierung der DRB-PCR verwendete Mykobakterien-Stämme und -DNA

	Patient	Segment a	Segment b	Segment c	Segment d	Segment e	Segment f
PCR	A/19	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	NA
Histo.	A/19	AFB mild Definite BU	AFB mild Definite BU	AFB moderate Definite BU	AFB moderate Definite BU	AFB mild Definite BU	NA
PCR	A/20	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	NA
Histo.	A/20	AFB moderate Definite BU	AFB mild Definite BU	AFB absent healing stage	AFB mild Definite BU	AFB mild Definite BU	NA
PCR	A/21	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
Histo.	A/21	AFB marked Definite BU	AFB marked Definite BU	AFB moderate Definite BU	AFB mild Definite BU	AFB absent Definite BU	AFB moderate Definite BU
PCR	A/22	Pos	Pos	Pos	NA	NA	NA
Histo.	A/22	AFB marked Definite BU	AFB moderate Definite BU	AFB mild Definite BU	NA	NA	NA
PCR	A/23	Pos	Pos	Pos	NA	NA	NA
Histo.	A/23	AF mild Definite BU	AFB absent Definite BU	AFB mild Definite BU	NA	NA	NA
PCR	A/24	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	NA
Histo.	A/24	AFB marked Definite BU	AFB marked Definite BU	AFB marked Definite BU	AFB mild Definite BU	AFB mild Definite BU	NA
PCR	A/30	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	NA
Histo.	A/30	AFB mild Definite BU	AFB mild Definite BU	AFB mild Definite BU	AFB absent Not BU	AFB mild Definite BU	NA
PCR	A/33	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
Histo.	A/33	AFB marked Definite BU	AFB marked Definite BU	AFB marked Definite BU	AFB mild Definite BU	AFB mild Definite BU	AFB mild Definite BU
PCR	A/34	Pos	Pos	Neg	Neg	NA	NA
Histo.	A/34	AFB moderate Definite BU	AFB moderate Definite BU	AFB mild Definite BU	AFB mild Definite BU	NA	NA
PCR	A/38	Pos	Neg	Pos	NA	NA	NA
Histo.	A/38	AFB moderate Definite BU	AFB moderate Definite BU	AFB mild Definite BU	NA	NA	NA
PCR	K1	Pos	Pos	Pos	Pos	NA	NA
Histo.	K1	AFB absent Definite BU	AFB mild Definite BU	AFB mild Definite BU	AFB mild Definite BU	NA	NA
PCR	K 2	Pos	Pos	Pos	NA	NA	NA
Histo.	K 2	AFB marked Definite BU	AFB marked Definite BU	AFB moderate Definite BU	NA	NA	NA
PCR	K 3	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	NA
Histo.	K 3	AFB marked Definite BU	AFB marked Definite BU	AFB marked Definite BU	AFB marked Definite BU	AFB marked Definite BU	NA
PCR	K 4	Pos	Pos	Pos	NA	NA	NA
Histo.	K 4	AFB absent Definite BU/	AFB absent Definite BU	AFB mild Definite BU	NA	NA	NA
PCR	K 5	Pos	Pos	Pos	Pos	NA	NA
Histo.	K 5	AFB marked Definite BU	AFB marked Definite BU	AFB marked Definite BU	AFB mild Definite BU	NA	NA
PCR	K 7	Pos	Pos	Pos	NA	NA	NA
Histo.	K 7	AFB moderate Definite BU	AFB mild Definite BU	AFB mild Definite BU	NA	NA	NA
PCR	K 9	Pos	Pos	Pos	Pos	NA	NA
Histo.	K 9	AFB marked Definite BU	AFB marked Definite BU	AFB moderate Definite BU	AFB mild Definite BU	NA	NA
PCR	K 12	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	NA
Histo.	K 12	AFB marked Definite BU	AFB marked Definite BU	AFB marked Definite BU	AFB mild Definite BU	AFB mild Definite BU	NA
PCR	K 15	Pos	Pos	Neg	Neg	NA	NA
Histo.	K 15	AFB moderate Definite BU	AFB mild Definite BU	AFB mild Definite BU	AFB moderate Definite BU	NA	NA
PCR	K 18	Pos	Pos	Pos	NA	NA	NA
Histo.	K 18	AFB marked Definite BU	AFB marked Definite BU	AFB marked Definite BU	NA	NA	NA

Tabelle 34 PCR- und Histopathologie-Ergebnisse, „Gradienten-Proben“

Segment a: zentrales Segment. **AFB:** acid fast bacilli; **BU:** Buruli ulcer; **Histo:** Histopathologie; **PCR:** Polymerase chain reaction; **pos:** positiv; **NA:** not available, Probe nicht vorhanden; **neg:** negativ

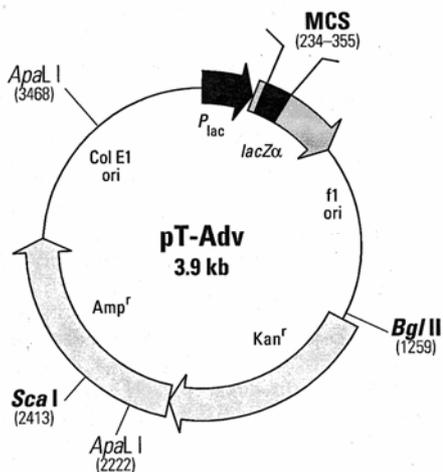


Abb. 8. pT-Adv-Plasmidvektor

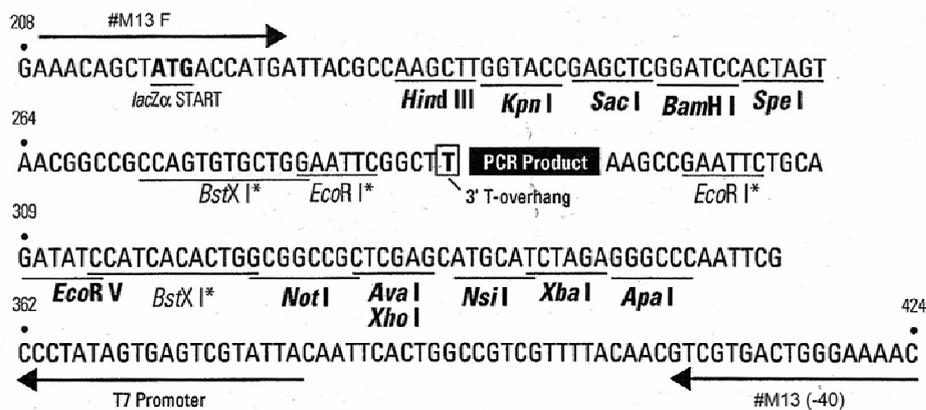


Abb. 9. Insertionsposition des Amplifikates innerhalb des pT-Adv-Plasmidvektors und Zielsequenzen der Primer zur Überprüfung der Insertion

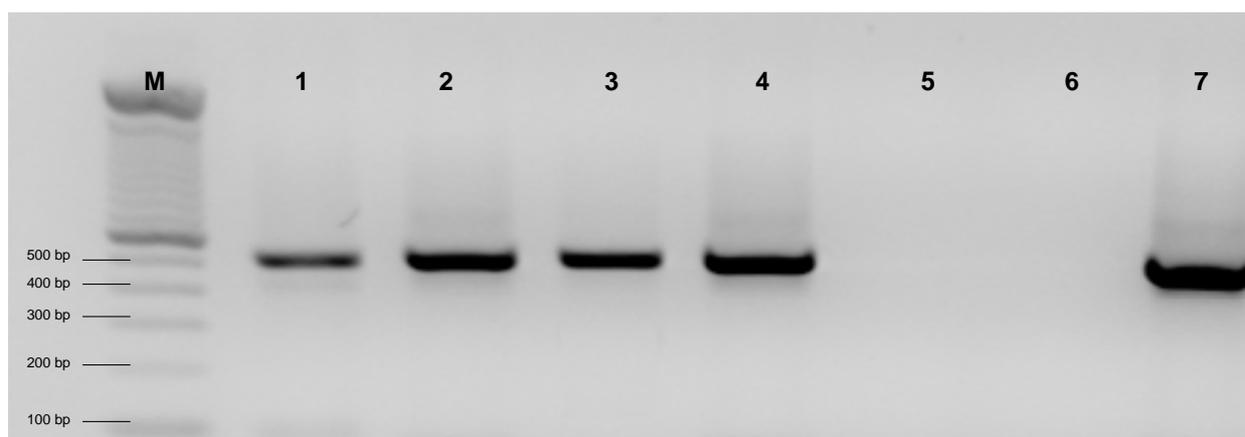


Abb. 10. Ergebnisauswertung Agarosegelelektrophorese.

M: 100 bp-Leiter (Marker), 1: Positive Patientenprobe (Originalextrakt 1:10 verdünnt); 2: Positive Patientenprobe (unverdünnt), 3: Inhibitionskontrolle zu 1; 4: Inhibitionskontrolle zu 2; 5: Negative Extraktionskontrolle; 6: Negative PCR-Kontrolle; 7: Positive PCR-Kontrolle

Clinical Form for Buruli Ulcer BU 01

A. INSTITUTIONAL INFORMATION

1. Name of Institution: _____
 2. Subdistrict: _____ District: _____ Region: _____
 3. Name of Officer completing this form: _____
 4. Title: _____

B. PATIENT INFORMATION

5. Health facility ID #: _____ Date of admission: ____/____/____
 6. Name: _____ Y. Age: ____/____/____ years K. Sex: M F
 7. Address: _____
 8. Subdistrict: _____ District: _____ Region: _____
 9. Occupation of patient: Student Farmer Others (Specify): _____
 10. Source of drinking water: Pipe-borne Borehole/well River/stream Pond/stream
 11. Patient classification: New case
 Recurrent: same site different site Date of Last treatment (dd/mm/yy): ____/____/____
 12. Duration of illness before seeking care: ____/____/____ weeks ____/____/____ months
 13. Use of traditional treatment N Y
 14. History of cases in family/among relatives: N Y
 15. History of trauma at site of lesion: N Y
 16. BCG vaccination or scar: N Y

C. LOCATION OF LESION(S)

17. Upper Limbs: Right Left Lower Limbs: Right Left Abdomen Back
 Buttocks & perianal Throat Head & neck

D. CLINICAL FORMS

18. Active: Nodule Papule Oedema Ulcer Osteomyelitis
 Inactive: Scar due to Buruli Ulcer Amputation due to Buruli Ulcer Plaque
 Other, specify: _____

19. Disability present upon presentation: N Y
 20. Date of clinical diagnosis (dd/mm/yy): ____/____/____

E. CONFIRMATION OF CLINICAL DIAGNOSIS

23.	ZN staining			Culture			Histopathology			PCR		
	Pos	Neg	ND									
	<input type="checkbox"/>											

Pos = Positive Neg = Negative ND = Not done

F. PRINCIPAL TREATMENTS

Wound dressing only Excision only Excision + primary closure
 Excision + split skin graft Amputation Heat

24. Antimicrobial agents, specify: _____
 Antibiotics and other drugs: _____
 Others: _____

G. TREATMENT OUTCOMES

Healed without sequelae
 Healed with sequelae, specify: _____
 Referral for treatment of active lesion: where: _____ Date: ____/____/____
 25. Abandoned/ discharged against medical advice
 Died, Buruli ulcer related, specify: _____
 Died, not related to Buruli ulcer, specify: _____

H. REFERRAL OF SEQUELAE

26. No, why not: _____
 Yes, where: _____ when (dd/mm/yy) ____/____/____

27. Date of Discharge (dd/mm/yy): ____/____/____

*** This form should be kept in the patient's record at the health facility where treatment is provided.
 GHS / Ministry of Health GHANA Buruli Ulcer Control Programme

Abb. 11. BU1-Formular

KCCR BU Data Entry Form Date:

A: Patient Identification Number:

Family name: First name:
 Age: Sex m f

B: Classification
 New case Relapse

C: Clinical Presentation
 Nodule Papule Ulcer
 Edema Plaque

D: Duration of Disease
 months / weeks

E: Location of the Lesion

17. Tor of ear Out Non
 18. Throat Out Non
 Members supérieurs:
 19. Droite Out Non
 20. Gauche Out Non
 21. Abdomen Out Non
 22. Dos Out Non
 23. Fesses, Périnée Out Non
 Members inférieurs:
 24. Droite Out Non
 25. Gauche Out Non

(Photographical) documentation: yes no

F: Distance from Center of Nodule / from Edge of Ulcer

Nodule

Tissue (T)
 Ø of nodule mm
 Take specimen from center of nodule, if other indicate distance from center.
 Distance from center mm
 Indicate place of origin into the sketch.
 Cut tissue specimen into 4 pieces:
 Tissue PCR_{KCCR} (TF_{KCCR})
 Tissue PCR_{LAM} (TF_{LAM})
 Tissue Culture (TC)
 Tissue Histopathology (TH)

Ulcer

Tissue (T) Swabs (S)
 Size of ulcer mm
 Take specimens from edge of ulcer, if other indicate distance from edge.
 Distance from edge mm
 Indicate place of origin into the sketch.
 Cut tissue specimen into 4 pieces:
 Tissue PCR_{KCCR} (TF_{KCCR})
 Tissue PCR_{LAM} (TF_{LAM})
 Tissue Culture (TC)
 Tissue Histopathology (TH)
 Take 3 swabs:
 Swab PCR_{KCCR} (S_{KCCR})
 Swab PCR_{LAM} (S_{LAM})
 Swab Culture (SC)

Non ulcerative tissue

Size of non ulcerative tissue mm
 Cut tissue specimen into 4 pieces:
 Tissue PCR_{KCCR} (TF_{KCCR})
 Tissue PCR_{LAM} (TF_{LAM})
 Tissue Culture (TC)
 Tissue Histopathology (TH)

papule
 plaque
 edema

G: Remarks

Abb. 12. Patienten-Daten-Erfassungs-Formular

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Löscher danke ich für die Aufnahme in die Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München, seine Unterstützung und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit, seine hilfreichen Anregungen sowie die Bereitschaft, die vorliegende Arbeit zu betreuen und vor der medizinischen Fakultät der LMU zu vertreten.

Herrn Prof. Dr. Fleischer, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg, danke ich für die Möglichkeit, den Beginn dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen und für die freundliche, enge Zusammenarbeit im Rahmen dieser Arbeit.

Bei Frau Dr. Bretzel bedanke ich mich besonders für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die Heranführung an die Thematik, die wissenschaftliche Betreuung sowie ihre fortwährende Gesprächsbereitschaft und Unterstützung, die für das Gelingen dieser Arbeit Voraussetzung waren.

Herrn Prof. Dr. Racz, Felicitas van Vloten und allen Mitarbeitern der Abteilung Pathologie des BNI danke ich für die Durchführung der histopathologischen Untersuchungen.

Bei Dr. Kruppa und Prof. Dr. Adjei möchte ich mich für die herzliche Aufnahme in die Labore des KCCR in Ghana sowie ihre permanente Gesprächsbereitschaft bedanken. Ruth Thompson und Kwame Asamoah-Opore danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit.

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologische Zentraldiagnostik (BNI) und der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere bedanke ich mich bei Karl-Heinz für seine Unterstützung bei den statistischen Berechnungen. KH, Du bist genial! Außerdem gilt mein besonderer Dank Christel, Erna und Anna, die mir in vielfältiger Weise immer unterstützend zur Seite standen.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Dennis, Susi, Daniela und Hella für eine tolle Zeit, an die ich immer noch gern zurück denke. Glück auf, Bochum!

Danke an meine fleißigen Korrekturleser Dennis und Helmut.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir meine Ausbildung ermöglicht haben, und meinen Freunden Silvi, Ilona, Nadine + Nadine und Konni. Danke für euren Rückhalt, dafür, dass ihr immer für mich da wart und an mich geglaubt habt. Ich danke euch für alles.

10 Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Name und Adresse **Vera Siegmund**
 Ottobeurer Straße 8, 80997 München
 Tel.: 0 89 / 21 80 36 18
 Email: vera.siegmund@lrz.uni-muenchen.de

Geburtstag und - ort: 14.05.1977, Bad Wildungen

Nationalität deutsch

Familienstand ledig

AUSBILDUNG

seit 04 / 2005 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**
 Ludwig-Maximilians-Universität München
 Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin

09 / 2003 - 03 / 2005 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**
 Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
 Abteilung Mikrobiologische Zentraldiagnostik

06 / 2002 - 8 / 2003 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**
 Ruhr-Universität Bochum
 Abteilung für Molekulare und Medizinische Virologie

04 / 2002 – 05 / 2002 **Wissenschaftliche Hilfskraft**
 Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
 Abteilung Mikrobiologische Zentraldiagnostik

04 / 2001 - 03 / 2002 **Diplomarbeit**
 Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
 Abteilung Mikrobiologische Zentraldiagnostik
 (Universität Kassel, Fachbereich Biologie/Chemie)
Titel: „Sequenzanalyse einer flankierenden Genomregion des
 Insertionselementes IS2404 und Etablierung einer 5'-Nuklease
 PCR zum Nachweis von *Mycobacterium ulcerans*."

1996 - 2002 **Studium der Diplom-Biologie**
 Universität Kassel