

Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
Leiter: Prof. Dr. med. T. Löscher
an der medizinischen Klinik und Poliklinik IV des
Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reincke

Labordiagnostik der Buruli Ulkus Erkrankung in Togo/Westafrika

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

vorgelegt von
Kristina Lydia Balbina Huber
aus
Freising

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin:	Prof. Dr. Gisela Bretzel
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Frank Ebel
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. Hans Wolff
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr.h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	30.01.2014

Teile der vorliegenden Dissertation wurden mit Genehmigung des Promotionsausschusses der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität vorab veröffentlicht:

Beissner M., **Huber K.L.**, Badziklou K., Halatoko W., Maman I., Vogel F., Bidjada B., Piten E., Helfrich K., Mengele C., Nitschke J., Amekuse K., Wiedemann F.X., Diefenhardt A., Kobara B., Herbringer K.H., Banla A., Prince-David M., Löscher T., Bretzel G., Implementation of a National Reference Laboratory for Buruli Ulcer Disease in Togo, PLoS Negl Trop Dis. 2013 Jan;

Bretzel G., **Huber K.L.**, Kobara B., Beissner M., Piten E., Herbringer K.H., Wiedemann F.X., Amekuse K., Banla Kere A., Helfrich K., Fleischmann E., Löscher T., Diefenhardt A., Nitschke J., Laboratory confirmation of Buruli ulcer disease in Togo, 2007-2010. PLoS Negl Trop Dis. 2011 Jul;

Herbringer K.H., Beissner M., **Huber K.**, Awua-Boateng N.Y., Nitschke J., Thompson W., Klutse E., Agbenorku P., Assiobo A., Piten E., Wiedemann F., Fleischmann E., Helfrich K., Adjei O., Löscher T., Bretzel G., Efficiency of fine-needle aspiration compared with other sampling techniques for laboratory diagnosis of Buruli ulcer disease. J Clin Microbiol. 2010 Oct;

Poster:

Huber K.L., Beissner M., Piten E., Maman I., Helfrich K., Mengele C., Bidjada B., Vogel F., Nitschke J., Wiedemann F., Herbringer K.H., Amekuse K., Badziklou K., Banla Kere A., Diefenhardt A., Kobara B., Löscher T., Bretzel G. External Quality Assurance for the Laboratory Diagnosis of Buruli Ulcer Disease in Togo. 102. Annual Meeting of the German Society for Tropical Medicine and International Health. Heidelberg, Germany, 2012.

Beissner M., Philips R., Maman I., Awua-Boateng N.Y., Sarfo F.S., **Huber K.L.**, Symanck D., Jansson M., Wawrzeczko A., Amekuse K., Nitschke J., Wiedemann F., Battke F., Badziklou K., Adjei O., Löscher T., Banla Kere A., Bretzel G. Comparative Study on Different DNA Amplification Techniques (LAMP, Real-Time and Conventional PCR) for the Molecular Diagnosis of Buruli Ulcer Disease. 102. Annual Meeting of the German Society for Tropical Medicine and International Health. Heidelberg, Germany, 2012.

Herbringer K.H., **Huber K.**, Awua-Boateng N.Y., Nitschke J., Thompson W., Klutse E., Agbenorku P., Assiobo A., Piten E., Wiedemann F., Beissner M., Fleischmann E., Helfrich K., Adjei O., Löscher T., Bretzel G. Fine Needle Aspiration Compared with other Sampling Techniques for the Diagnosis of Buruli Ulcer Disease. 101. Annual Meeting of the German Society for Tropical Medicine and International Health. Munich, Germany, 2009.

Abkürzungsverzeichnis

AAF	Feinnadelaspirat (franz.: A spiration par a iguille f ine)
AFB	säurefeste Stäbchen (engl.: a cid f ast b acilli)
AITM	A bteilung für I nfektions-und T ropen M edizin an der medizinischen Klinik und Poliklinik IV des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
BU	B uruli U lkus (engl.: Buruli ulcer)
BUD	Buruli Ulkus Erkrankung (engl.: B uruli u lcer d isease)
°C	Grad C elsius
CHR	C entre H ospitalier R egional
CHP	C entre H ospitalier P réfectoral
CLA	C larithromycin
CLS	Zell-Lysepuffer (engl. : cell lysis solution)
d	Tag (lat.: d ies)
DAHW	D eutsche Lepra und Tuberkulose H ilfe e.V. (vormals: D eutsches A ussätzigen H ilfsw e rk)
DAHWT	D eutsche Lepra und Tuberkulose H ilfe e.V. (vormals: D eutsches A ussätzigen H ilfsw e rk), Regionalbüro T ogo
DNA	D esoxyribonukleinsäure (engl.: d eoxyribonucleic a cid)
DNA-Hyd	D N A - H ydration-Lösung
dNTP(s)	D esoxy- N ukleotid t riphosphat(e)
FNA	Feinnadelaspirat (engl.: fine needle aspirate)
GBUI	G lobal B uruli U lcer I nitiative
h	Stunde (lat.: h ora; engl.:hour)
IS	I nsertionssequenz
Kg	K ilogramm
kPa	K ilopascal
LMU	Ludwig- M aximilians- U niversität München
m.	Monat (engl.: m onth)
M.	M ykobakterium (engl.: mycobacterium)
M	M olar
MBp	M egabasen p aare
Mg	M illigramm
MgCl2	M agnesium ch lorid
Min.	M inute (n)
ml	M illiliter
mm	M illimeter
µl	Mikroliter
N	N atürliche Zahl (z.B.: 1, 2, ..)
NaOH	N atrium- H ydroxid
ng	N anogramm
OM	O steomyelitis
OT	O bjektträger
RMP	R ifampicin
RT	R aum t emperatur
pH	lat.: p otentia h ydrogenii

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: p olymerase c hain r eaction)
PNLUB	Programme N ational de L utte contre L'Ulcère de B uruli
PNLUB-LP	Programme N ational de L utte contre L'Ulcère de B uruli - L èpre et P ian
PPS	Proteinpräzipitationslösung (engl.: p rotein p recipitation s olution)
SM	Streptomycin
SOP	Standardarbeitsanweisung (engl.: s tandard o perating p rocedure)
TAG	T echnical A dvisory G roup on BU/WHO
U	Einheit (engl.: u nit)
UB	Buruli Ulkus (franz.: L' U lcère de B uruli)
µM	Mikro-molar
ün	über N acht
USP	U nité de S oins P éripherique
UV	ultraviolett
V	Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.: W orld H ealth O rganization)

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung.....	1
1.1	Definition.....	1
1.2	Historischer Hintergrund.....	1
1.3	Epidemiologie.....	1
1.4	Transmission.....	2
1.5	Erreger.....	3
1.6	Klinisches Bild und Differentialdiagnose.....	3
1.7	Diagnostik.....	4
1.8	Therapie.....	5
1.9	Situation in Togo.....	6
2	Problemstellung und Zielsetzung.....	7
2.1	Problemstellung.....	7
2.2	Zielsetzung.....	7
3	Material und Methoden.....	8
3.1	Material.....	8
3.1.1	Chemikalien.....	8
3.1.2	Enzyme.....	8
3.1.3	Nukleotide und Nukleinsäuren.....	8
3.1.4	Reagenzsystem.....	9
3.1.5	Geräte.....	9
3.1.6	Weiteres Labormaterial.....	10
3.1.7	Material zur standardisierten Probenabnahme in Togo.....	10
3.1.8	Diagnostisches Probenmaterial.....	11
3.2	Methoden.....	11
3.2.1	Ablauf.....	11
3.2.2	Ethische Voraussetzungen.....	11
3.2.3	Einschluss- und Ausschlusskriterien.....	12
3.2.4	Rekrutierung der BUD-Verdachtsfälle.....	12
3.2.5	BUD Verdachtsfälle und diagnostisches Probenmaterial.....	12
3.2.5.1	Etablierung von standardisierten Probenentnahme-Sets.....	12
3.2.5.2	Art und Anzahl der diagnostischen Proben pro BUD-Verdachtsfall.....	13
3.2.5.3	Standardisierte Probenentnahme.....	13
3.2.5.4	Konservierung und Transport der diagnostischen Proben.....	14

3.2.5.4.1	Mikroskopie.....	14
3.2.5.4.2	PCR	14
3.2.5.5	Art und Herkunft der diagnostischen Proben	14
3.2.5.6	Datenerfassung und -archivierung	15
3.2.5.7	Datenmanagement.....	15
3.2.6	Angewandte Labormethoden zum Nachweis von <i>M. ulcerans</i>	16
3.2.6.1	Mikroskopie	16
3.2.6.1.1	Ziehl-Neelsen Färbung.....	16
3.2.6.1.2	Beurteilung der Mikroskopie.....	16
3.2.6.2	PCR–Diagnostik.....	16
3.2.6.2.1	Nukleinsäurepräparation aus diagnostischem Patientenmaterial.....	16
3.2.6.2.2	Lagerung der DNA Extrakte	17
3.2.6.2.3	Konventionelle IS2404 PCR	17
3.2.6.2.4	Ergebnisbeurteilung mittels Gelelektrophorese	17
3.2.6.2.5	Interne Qualitätskontrolle.....	17
3.2.7	Qualitätskontrolle.....	17
3.2.7.1	Externe Qualitätskontrolle	17
4	Ergebnisse.....	19
4.1	Durchführung der unter 3.2.1 geplanten Studie.....	19
4.1.1	Patientenrekrutierung.....	19
4.1.2	Epidemiologische Basisdaten der BUD-Verdachtsfälle	19
4.1.2.1	Herkunft der BUD-Verdachtsfälle.....	19
4.1.2.2	BUD-Verdachtsfälle pro Beobachtungsperiode und Kalenderjahr.....	19
4.1.2.2.1	BUD-Verdachtsfälle pro Läsionsart und Beobachtungsperiode.....	19
4.1.2.2.2	BUD-Verdachtsfälle pro Läsionsart und Kalenderjahr	20
4.1.2.3	Erkrankungsdauer der BUD-Verdachtsfälle pro Beobachtungsperiode und Kalenderjahr	21
4.1.2.3.1	Erkrankungsdauer der BUD-Verdachtsfälle pro Beobachtungsperiode.....	21
4.1.2.3.2	Erkrankungsdauer der BUD-Verdachtsfälle pro Kalenderjahr	22
4.1.3	Etablierung der standardisierten Verfahren zur Probenabnahme.....	22
4.1.3.1	Schulungen zur standardisierten Probenabnahme	22
4.1.3.2	Rücklauf der standardisierten Probenabnahme-Sets	23
4.1.4	Untersuchungsergebnisse der Labordiagnostik aus Probenmaterial	23
4.1.4.1	Positivitätsraten der getesteten Proben	23

4.1.5	Labordiagnostische Untersuchungsergebnisse der BUD-Fälle.....	24
4.1.5.1	BUD-Fallbestätigung durch Mikroskopie.....	24
4.1.5.2	BUD-Fallbestätigung durch IS2404 PCR.....	25
4.1.5.2.1	PCR-Bestätigung der BUD-Fälle mit nicht-ulzerativen Läsionen	25
4.1.5.2.2	PCR-Bestätigung der BUD-Fälle mit ulzerativen Läsionen	25
4.1.5.2.3	Rücklauf der standardisierten Probeabnahme-Sets pro BUD-Fall.....	26
4.1.6	Entwicklung der PCR-Fallbestätigung.....	27
4.1.6.1	Entwicklung der PCR-Fallbestätigungsraten pro Beobachtungsperiode und Kalenderjahr	27
4.1.6.1.1	Entwicklung der PCR-Fallbestätigung pro Beobachtungsperiode.....	27
4.1.6.1.2	Entwicklung der PCR-Fallbestätigung pro Kalenderjahr.....	27
4.1.6.2	Entwicklung der PCR-Fallbestätigungsrate pro Läsionsart.....	28
4.1.6.2.1	Entwicklung der PCR-Fallbestätigungsrate pro Läsionsart und Beobachtungsperiode	28
4.1.6.2.2	Entwicklung der PCR-Fallbestätigungsrate pro Läsionsart und Kalenderjahr	28
4.1.6.3	Erkrankungsdauer der BUD-Fälle	29
4.1.6.3.1	Erkrankungsdauer der BUD-Fälle pro Läsionsart und Kalenderjahr	30
4.1.6.4	M. ulcerans-Nachweis bei BUD-Verdachtsfällen mit Sekundärläsion.....	30
4.1.6.4.1	BUD-Verdachtsfälle mit zweiter Läsion.....	30
4.1.6.4.2	Entwicklung der BUD-Fallbestätigung bei Folgeuntersuchung	30
4.1.6.5	Lokalisation und WHO-Kategorie der PCR-bestätigten BUD-Läsionen	31
4.1.7	Ergebnisse der externen Qualitätskontrolle der Mikroskopie	31
4.1.7.1	Positivitätsraten der mikroskopischen EQA.....	31
4.1.7.2	Konkordanzraten der mikroskopischen EQA bezogen auf Objektträger	31
4.1.7.3	Konkordanzraten der mikroskopischen EQA bezogen auf Patienten	31
4.1.8	Epidemiologische Basisdaten der bestätigten BUD-Fälle.....	31
4.1.8.1	Alter und Geschlecht der BUD-Fälle.....	31
4.1.8.2	Kartographische Erfassung der Wohnorte der BUD-Fälle, Region Maritime.....	33
4.1.8.2.1	Orientierende Übersichtskarte, Togo.....	33
4.1.8.2.2	BUD-Falldistribution anhand der Karte von Region Maritime, Togo	34
4.1.8.3	Herkunft der BUD-Patienten	34
4.1.8.4	BUD-Fallverteilung innerhalb der Bezirke Yoto und Zio, Region Maritime	35
4.1.8.5	BUD-Fälle im Bezirk Yoto, Region Maritime	35
4.1.8.6	BUD-Fälle im Bezirk Zio, Region Maritime.....	35
5	Diskussion.....	37

5.1	Stellenwert der Mikroskopie und PCR für die Diagnostik der BUD.....	37
5.1.1	Mikroskopie.....	37
5.1.2	Mikroskopische Diagnostik und externe Qualitätssicherung der BUD in Togo.....	37
5.1.3	Polymerase-Kettenreaktion.....	38
5.1.4	PCR-Diagnostik der Buruli Ulkus Erkrankung in Togo.....	39
5.2	Methodentransfer und Schulungen	39
5.3	Beitrag der BUD-Diagnostik zur Epidemiologie	40
6	Folgestudie und Ausblick.....	42
7	Zusammenfassung.....	43
8	Literaturverzeichnis.....	44
9	Danksagung	49
10	Publikationen.....	50
11	Anhang.....	51
11.1	Herkunftsorte der klinischen BUD-Verdachtsfälle	54
11.2	Anleitung zur Färbung nach Ziehl-Neelsen	60
11.3	Anleitung zur Nukleinsäurepräparation aus klinischen Patientenproben	60

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vorkommen der BUD weltweit 2

Abb. 2: Nicht-ulzerative und ulzerative Formen der BUD 4

Abb. 3: Einfahrt CHR Maritime, Tsévié; Nationales BUD-Referenzzentrum 6

Abb. 4: Entwicklung der BUD-Fallbestätigung pro Beobachtungsperiode..... 27

Abb. 5: Altersverteilung der BUD-Fälle 32

Abb. 6: Orientierende Übersichtskarte Togo 33

Abb. 7: BUD-Fallverteilung Region Maritime 34

Abb. 8: Patienteneinverständniserklärung..... 51

Abb. 9: Ethik Abkommen..... 51

Abb. 10: Deklaration der Patientenaufklärung 52

Abb. 11: Data entry form Togo..... 52

Abb. 12: WHO-Form: UB 01 I..... 52

Abb. 13: WHO-Form: UB 01 II..... 53

Abb. 14: WHO-Form: UB 02 53

Abb. 15: WHO-Form: UB 03 53

Abb. 16: Specimen-set OP 57

Abb. 17: BUD-case-finding..... 58

Abb. 18: Diagnostik- und Probenabnahmeschulung..... 58

Abb. 19: Probenabnahmeschulung 59

Abb. 20: Mikroskopisches Präparat nach Ziehl-Neelsen Färbung..... 59

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Chemikalien	8
Tab. 2: Enzyme	8
Tab. 3: Nukleotide und Nukleinsäuren.....	9
Tab. 4: Geräte.....	10
Tab. 5: Labormaterial	10
Tab. 6: Material zur Probenabnahme in Togo.....	10
Tab. 7: Inhalt standardisierter Probeabnahme-Sets	13
Tab. 8: Mindestanzahl diagnostischer Proben pro Läsion und BUD-Verdachtsfall.....	13
Tab. 9: Anzahl der analysierten Proben pro Testverfahren und Herkunft.....	15
Tab. 10: Beurteilungsschema für AFB-Mikroskopie	16
Tab. 11: BUD-Verdachtsfälle pro Beobachtungsperiode	20
Tab. 12: BUD-Verdachtsfälle pro Kalenderjahr	20
Tab. 13: Erkrankungsdauer der BUD-Verdachtsfälle pro Beobachtungsperiode.....	21
Tab. 14: Erkrankungsdauer der BUD-Verdachtsfälle pro Kalenderjahr	22
Tab. 15: Anzahl der standardisierten Probeabnahmesets pro BUD-Verdachtsfall	23
Tab. 16: Positivitätsraten der getesteten Proben	24
Tab. 17: BUD-Fallbestätigungsraten.....	26
Tab. 18: Anzahl der standardisierten Probeabnahmesets pro BUD-Fall.....	27
Tab. 19: BUD-Fälle pro Läsionsart und Beobachtungsperiode.....	28
Tab. 20: BUD-Fälle pro Läsionsart und Kalenderjahr	28
Tab. 21: Erkrankungsdauer der BUD-Fälle pro Läsionsart und Beobachtungsperiode.....	29
Tab. 22: Erkrankungsdauer der BUD-Fälle pro Läsionsart und Kalenderjahr.....	30
Tab. 23: Einteilung der bestätigten BUD-Läsionen nach WHO Kategorien.....	31
Tab. 24: BUD-Fälle pro Beobachtungsperiode, Bezirk Yoto	35
Tab. 25: BUD-Fälle pro Beobachtungsperiode, Bezirk Zio.....	35
Tab. 26: Anzahl und Herkunft der BUD-Verdachtsfälle.....	57
Tab. 27: AFB-Färbung nach Ziehl-Neelsen.....	60
Tab. 28: Nukleinsäurenpräparation aus diagnostischem Patientenmaterial.....	60

1 Einleitung

1.1 Definition

Die Buruli Ulkus Erkrankung (engl.: Buruli ulcer disease; BUD) ist eine durch *Mycobacterium ulcerans* verursachte Infektionskrankheit der Haut und des subkutanen Fettgewebes [1, 2].

1.2 Historischer Hintergrund

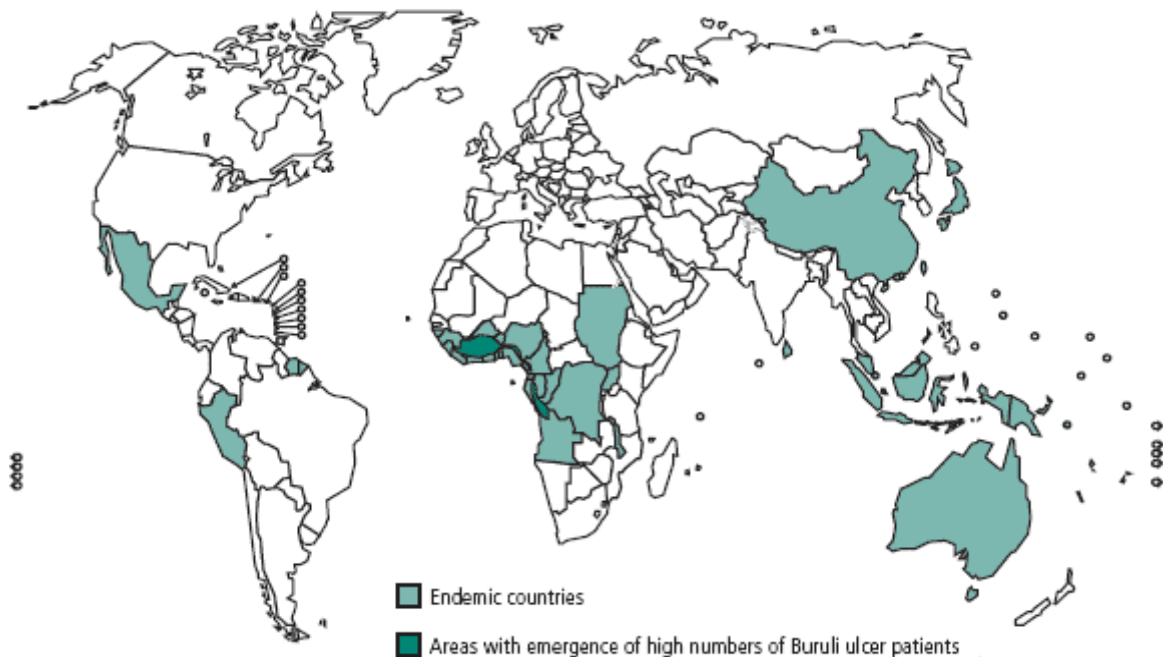
Der britische Mediziner Sir Albert Cook berichtete 1897 erstmals über großflächige Hautgeschwüre in Uganda, die heute mit dem klinischen Bild der BUD in Einklang gebracht werden können [3-5]. 1948 wurde das Auftreten dieser Infektionskrankheit bei sechs Landarbeitern aus der Umgebung von Bairnsdale [5], nahe Melbourne in Australien, von Peter Mac Callum und Kollegen beschrieben, weshalb diese Erkrankung in Australien gegenwärtig auch „Bairnsdale Ulcer“ genannt wird. Mac Callum et al. gelang die Erstisolierung und Erstbeschreibung von „*Mycobacterium ulcerans*“, dem ätiologischen Agens der BUD [6, 7]. Mit Beginn der 1960er Jahre wurden aus dem Buruli County (heute Nakasongola Distrikt) in Uganda erneut vermehrt Fälle von großflächigen Hautulcerationen gemeldet. Die heute gebräuchlichste Bezeichnung „Buruli Ulcer“ (BU) findet hier ihren Ursprung [8, 9]. Seit den 1980er-Jahren wird zunehmend von weiteren Fällen aus vier Kontinenten (Afrika, Amerika, Asien, Australien) berichtet [4], wobei die Länder Westafrikas den globalen epidemiologischen Fokus darstellen [4, 10-12]. Die kontinuierliche Zunahme der gemeldeten Fälle veranlasste die Weltgesundheitsorganisation (WHO) dazu, 1998 die Global Buruli Ulcer Initiative (GBUI) zu gründen (www.who.int/buruli/en). Optimierung von Labordiagnostik, Therapie und Prävention, sowie Bestimmung von Forschungsschwerpunkten wurden als Ziele der „World Health Assembly“ (WHA) 2004 und in der „Cotonou Declaration on Buruli Ulcer“ 2009 verabschiedet [4, 12, 13].

1.3 Epidemiologie

BUD ist weltweit die dritthäufigste, in einigen westafrikanischen Ländern wie etwa der Elfenbeinküste, sogar die zweithäufigste mykobakterielle Infektionskrankheit bei immunkompetenten Menschen [11, 14-17]. Die Erkrankung tritt in über 30 subtropischen und tropischen Ländern endemisch auf [5, 17-19].

Die folgende Abbildung veranschaulicht das Vorkommen der BUD weltweit:

Fig. 1. Countries where Buruli Ulcer has been reported



Buruli ulcer has been reported from many countries, but most cases in the last two decades have been identified in a strip of riverine areas in a number of countries in the western part of the African continent; underreporting is believed to be common. Source: WHO; <http://www.who.int/gtb-buruli/> WHO 05.126

Abb. 1: Vorkommen der BUD weltweit

Die Länder mit den höchsten Inzidenzraten sind Benin, Ghana und die Elfenbeinküste [5, 11, 17, 18, 20]. Entsprechend WHO-Angaben wurden im Zeitraum von 2004 bis 2008 26.275 Fälle aus 16 Ländern verzeichnet (persönliche Kommunikation mit Dr. Kingsley Asiedu, GBUI, WHO). Gemäß der TAG/WHO-Daten („Technical Advisory Group on BU/WHO“) der jährlichen WHO-Konferenzen wurden im Zeitraum von fünf Jahren (2004 bis 2008) 1393 BUD-Fälle in Togo erfasst. Die genannten Zahlen sind Schätzungen, die meist auf klinischen Angaben beruhen, somit weder die tatsächliche Prävalenz noch die präzise Inzidenz widerspiegeln [21]. Innerhalb der BUD-Endemiegebiete wird häufig eine fokale Verteilung der Erkrankungsfälle beobachtet [22-24]. BUD tritt in Gebieten mit großer Armut, in ursprünglichen, ländlichen Gegenden, meist in der Umgebung von Sümpfen oder langsam fließenden Flüssen, auf [5, 11, 18, 25, 26]. Die Erkrankung zeigt eine ausgeglichene Geschlechterverteilung in allen Altersgruppen, wobei über 50 % der Betroffenen unter 15 Jahre alt sind [5, 11, 26]. Der Einfluss einer HIV-Coinfektion auf den Schweregrad der BUD-Manifestation wurde aktuell erneut diskutiert (persönliche Kommunikation mit Dr. Kingsley Asiedu, GBUI, WHO). Bislang konnten vor allem schwere disseminierte Verläufe bei HIV-infizierten Patienten beobachtet werden [2, 11, 27-30].

1.4 Transmission

Die Assoziation des Auftretens von BUD mit stehenden und langsam fließenden Gewässern, mit Tieren sowie mit Umweltfaktoren wie Regen- und Trockenzeit wird vielfach diskutiert [8, 14, 18, 24-26, 31-35]. In einem Endemiegebiet im Süd-Westen Australiens wurden *M. ulcerans* Infektionen bei wild lebenden (Koalas, Possums, Potaroos) und domestizierten Tieren (Katzen, Hunden, Pferden)

beobachtet [24]. Mittels PCR-Diagnostik (engl.: polymerase chain reaction, PCR) wurde in Läsionen und/oder den Fäces von in Menschnähe lebenden Possums (lat.: *Pseudocheirus peregrinus*) sowie in einigen Mosquitoarten (lat.: *Aedes sp.*; *Coquillettidia sp.*; *Culex sp.*) DNA von *M. ulcerans* nachgewiesen [11, 18, 24]. In afrikanischen Ländern konnte mit Hilfe des gleichen Verfahrens *M. ulcerans* DNA in Wasser- und Bodenproben, in Wasserpflanzen, -organismen, -insekten (lat.: *Belastomatidae*; *Naucoridae*; *Hydrophilidae*) und Schnecken (lat.: *Bulinus sp.*; *Tilapia sp.*) nachgewiesen werden [11, 14, 18, 24, 25, 34]. Demzufolge wird ein Zusammenhang zwischen Infektion von Tieren und der Transmission auf den Menschen diskutiert [8, 24]. Auf der Ebene der Genomsequenzanalyse konnte mittels des „Single Nucleotide Polymorphism Typing“ (SNP-Typing) durch Vergleich von sieben *M. ulcerans* Stämmen aus einem ghanaischen Endemiegebiet die fokale Transmission eines einzigen *M. ulcerans* Haplotypen nachgewiesen werden [11, 26]. Der exakte Übertragungsweg von *M. ulcerans* auf den Menschen ist jedoch ungeklärt und Gegenstand internationaler Forschung [8, 24, 34, 35]. Es gibt derzeit keinen Anhalt für eine Übertragung von Mensch zu Mensch [5, 11, 36].

1.5 Erreger

BUD wird von *Mycobacterium ulcerans*, einem grampositiven, säurefesten, nicht-chromogenen, langsam wachsenden Stäbchenbakterium aus der Familie der *Mycobacteriaceae*, Gattung *Mycobacterium*, den atypischen Mykobakterien (MOTT: „*Mycobacteria other than tuberculosis*“) zugehörig, verursacht [37]. Das *M. ulcerans* Genom (5.8 MBp) besteht aus zwei zirkulären Replikons und weist über 98% Sequenzhomologie zum Genom von *M. marinum* auf [11, 24, 38-40]. Es konnten weltweit bislang elf verschiedene Genotypen von *M. ulcerans* mittels Analyse von „variable number (of) tandem repeats“ (VNTR) beschrieben und entsprechend der geographischen Herkunft in vier Cluster aufgeteilt werden (Westafrika, Ostafrika, Asien, Südost-Asien) [40, 41]. Ein wesentlicher Pathogenitätsfaktor ist das von *M. ulcerans* produzierte, plasmidkodierte Exotoxin „Mykolakton“; der geographischen Abstammungslinie entsprechend kommen folgende Kongenere vor: Mykolakton A/B, Afrika; Mykolakton C, Asien/Australien; Mykolakton D, Asien. Es werden mehrere Strukturvarianten mit unterschiedlicher Aktivität beschrieben [18, 39, 40, 42-44]. Neben der direkt zytotoxischen Wirkung, die u.a. zu Gewebsnekrose führt [11, 14, 44], verursacht das Exotoxin eine Immunmodulation, die sich in einer Unterdrückung der primären T-Zellantwort und verminderten Rekrutierung von Entzündungszellen zeigt [11, 18, 45]. Demzufolge leiden die Patienten häufig weder an Schmerzen noch an systemischen Entzündungsreaktionen [8, 11, 14, 44].

1.6 Klinisches Bild und Differentialdiagnose

BUD manifestiert sich an der Haut und dem subkutanen Fettgewebe [1, 2, 5, 10, 11, 37, 46-49]. Eine Miteinbeziehung der Knochenhäute (Periostitis), der Knochen (Ostitis) und/oder des Knochenmarks (Osteomyelitis) ist seltener bei schweren und weit fortgeschrittenen Erkrankungsfällen beschrieben [5, 8, 11, 27, 45]. Das Krankheitsbild der BUD manifestiert sich überdurchschnittlich häufig an den Extremitäten [5, 11, 18, 50] und tritt als nicht-ulzerative sowie ulzerative Form auf. Die nicht-ulzerative Form manifestiert sich als schmerzlose papuläre oder noduläre Schwellung, als Plaque und/oder als Bindegewebsödem [8, 10, 11, 36, 47, 51]. Innerhalb kurzer Zeit können sich unbehandelt aus den nicht-ulzerativen Formen großflächige schmerzlose Ulzerationen mit charakteristisch tief unterminierten Rändern ausbilden [5, 11, 47, 51, 52], die von umgebenden Ödemen begleitet sein können [5, 37, 47]. Die klinischen Manifestationen der BUD werden gemäß

der WHO in drei Kategorien klassifiziert [20, 37]. Kategorie I: einzelne Läsion, Ausdehnung: Durchmesser < 5 cm; Kategorie II: einzelne Läsion, Ausdehnung: Durchmesser 5 cm - 15 cm; Kategorie III: einzelne Läsion, Ausdehnung: Durchmesser > 15 cm, multiple Läsionen sowie Läsionen an kritischen Lokalisationen wie Auge, Brust oder Genital [20, 37]. In vielen Fällen kommt die Erkrankung auch unbehandelt zum Stillstand, wobei die Heilung mit starker Narbenbildung einhergeht [20, 47, 49, 51, 53, 54]. Obgleich die Mortalität dieser Erkrankung niedrig ist, leben 6% bis 50% der nicht/oder spät therapierten Patienten mit permanenten Bewegungseinschränkungen aufgrund von Kontrakturen, wie auch mit entstellenden Narben, die in der Regel Stigmatisierung und soziale Ausgrenzung zur Folge haben [11, 20, 49, 51, 54-60].



Abb. 2.1: Ödem



Abb. 2.2: Plaque



Abb. 2.3: Nodulus



Abb. 2.4: Ulkus



Abb. 2.5: Osteomyelitis



Abb. 2.6: Kontraktur

Abb. 2: Nicht-ulzerative und ulzerative Formen der BUD

Quelle Abb.2.1 -2.5: <http://www.who.int/buruli/photos/complications/en/index.html>, Abb.2.6: K. Huber

Als Differenzialdiagnosen werden den Krankheitsstadien entsprechend sowohl nicht-infektiöse als auch infektiöse Erkrankungen in Betracht gezogen [37, 56, 61]. Unter den nicht infektiösen Erkrankungen differenziert man u.a. allergische Hautreaktionen, Lymphangitiden, Lymphangiome, diabetische oder variköse Ulzera, Hautwunden und Malignome ebenso Autoimmunerkrankungen wie z.B. Psoriasis [10, 11, 61, 62]. Innerhalb der infektiösen Erkrankungen sind neben anderen Mykobakteriosen wie der Hauttuberkulose und Lepra, u.a. Onchozerkose, kutane Leishmaniose, tropisches Ulkus, nekrotisierende Fasciitis, Mykosen sowie superinfizierte Verbrennungen von der BUD abzugrenzen [10, 11, 61, 62].

1.7 Diagnostik

Als Untersuchungsmaterialien für den bakteriologischen Nachweis von *M. ulcerans* eignen sich Wundabstriche oder Gewebeprobe (Feinnadelaspirate [FNA], Stanzbiopsien oder operativ exzidiertes Gewebe) ausgezeichnet [1, 46, 47, 63, 64]. Die Entnahmestelle der diagnostischen Probe richtet sich nach der Lokalisation der Mykobakterien im Krankheitsverlauf. Daher wird das diagnostische Gewebe bei nicht-ulzerativen Läsionen aus dem Zentrum, bei ulzerativen Läsionen aus dem Randbereich von nekrotischem zu makroskopisch gesund erscheinendem Gewebe entnommen [1, 46, 63].

Derzeit stehen vier Methoden zur Labordiagnostik zur Verfügung [1, 5, 8, 11, 18, 37, 46, 64, 65]:

1. Mikroskopische Analyse nach Ziehl–Neelsen, Kinyoun oder Auramin-Rhodamin gefärbter Präparate, die aus Wundabstrichen, FNA und/oder Stanzbiopsien angefertigt werden. Die Sensitivität wird mit 50-70% angegeben [1, 14, 46-48, 66, 67].
2. Die Inokulation von *M. ulcerans* Kulturen aus Wundabstrichen oder Gewebeproben stellt derzeit den einzigen Viabilitätsnachweis dar. Das Temperaturoptimum zur Kultur auf Löwenstein-Jensen Nährböden liegt zwischen 29° und 33° Celsius [1, 68, 69]. Die Kulturen benötigen zum Wachstum circa 6-12 Wochen, weshalb sich dieses Verfahren nicht zum zeitnahen Nachweis von viablen *M. ulcerans* eignet. Die Sensitivität wird mit 40 – 70% angegeben [1, 37, 47, 70].
3. Die PCR wird bei einer Spezifität von 100% und einer Sensitivität von 85 - 94% als Goldstandard der BUD-Diagnostik beschrieben [1, 18, 47]. Die am häufigsten zur Detektion von *M. ulcerans* DNA verwendete IS2404 PCR weist das im mykobakteriellen Genom in über 200-facher Kopie vorhandene Insertionselement IS2404 nach [1, 8, 71, 72]. Laut WHO-Richtlinien sollen mindestens 50% aller BUD-Fälle weltweit mittels PCR bestätigt werden [1, 2, 50, 63].
4. Histopathologische Untersuchungen von operativ gewonnenen Biopsien sind zur Diagnosesicherung geeignet, wenn Mikroskopie, PCR und Kultur negative Ergebnisse zeigen oder primär chirurgisch vorgegangen wird. Sie ermöglichen aufgrund charakteristischer histopathologischer Merkmale die Diagnose auch bei bakteriologisch negativ getesteten Spät- und Heilungsstadien. Desweiteren dient die Histopathologie der Differentialdiagnostik. Die Sensitivität wird mit 90%, die Spezifität mit nahezu 100% angegeben [1, 37, 47, 70].

1.8 Therapie

Bis 2004 bestand die Therapie der BUD in Westafrika primär aus weiträumiger chirurgischer Exzision ggf. mit adjuvanter Antibiotika-Therapie (Rifampicin und Streptomycin, [RMP + SM]) und falls erforderlich mit anschließender Spalthautabdeckung. Bei rein chirurgisch therapierten BUD-Fällen wurden Rezidivraten von über 30% beobachtet [20, 73, 74]. In Untersuchungen von Exzisionsrändern ulzerativer Läsionen, die aus makroskopischer Sicht der Chirurgen im Gesunden exzidiert worden waren, konnte weiterhin *M. ulcerans* DNA nachgewiesen werden [75-77]. Dagegen konnten nicht-ulzerative Läsionen durch alleinige Exzision im Ganzen - mit ausreichendem Sicherheitsabstand - kurativ therapiert werden [75]. Seit 2004 wird gemäß WHO-Empfehlungen eine standardisierte antimykobakterielle Kombinationstherapie mit RMP (10 mg/kg KG/d, p. o.) und SM (15 mg/kg KG/d, i. m.) angewandt [12, 49]. Patienten der Kategorie I und II werden 56 Tage mit RMP (10 mg/kg KG/d; oral) und SM (15mg/kg KG/d; i. m.) therapiert [11, 18, 36, 49]. Bei Patienten der Kategorie III, kann ein chirurgischer Eingriff nach mindestens vierwöchiger Antibiose (RMP + SM), sowie eine Verlängerung der Antibiose auf 12 Wochen, den Heilungsprozess unterstützen [18, 20, 55]. Die Behandlung von Läsionen der Kategorien I und II mit rein oral zu verabreichender kombinierter Medikation (RMP + Clarithromycin [CLA] über 8 Wochen) wurde von mehreren klinischen Studien als kurativer Therapieansatz beschrieben [11, 18, 49, 78, 79]. Eine Alternative zur Chemotherapie wurde 2009 in der „Phase Change Material“ (PCM) - Thermotherapie Studie in Ayos/Kamerun erfolgreich klinisch getestet [80]. Diverse Forschungsgruppen analysieren labortechnisch die Wirkstoffe von zahlreichen Pflanzen und Bäumen, wie z.B. *Morinda citrifolia*, *Borrhichia frutescens*, *Ferula communis* um die Phytotherapiemethoden der traditionellen Heiler und Naturheilkundigen Afrikas zukünftig klinisch zu prüfen [8, 81, 82].

1.9 Situation in Togo

Seit Beginn der 1990er Jahre wurden in Togoischen Versorgungszentren rein klinisch diagnostizierte BUD-Verdachtsfälle behandelt [50, 83-85]. Meyers et al. beschrieben 1996 die ersten zwei laborbestätigten togoischen Patienten aus den Distrikten Yoto und Vo der Region Maritime [84]. Im Zeitraum von 1994 bis 2007 wurden durch eine Vielzahl von Studien über 2000 klinisch diagnostizierte BUD-Verdachtsfälle beschrieben, wovon weniger als 5% (90/2000) laborbestätigt wurden [17, 50, 83, 85]. Das Togoische Nationalprogramm „Programme National de Lutte contre L’Ulcère de Buruli“ (PNLUB) wurde im Jahre 1999 unter Schirmherrschaft der WHO etabliert [17, 50] und 2010 zum „Programme National de Lutte contre L’Ulcère de Buruli – Lépre et Pian (PNLUB-LP)“ erweitert [21]. Begrenzte finanzielle und logistische Ressourcen sowie wechselnde Programmleitungen erschwerten zunächst eine mit den Nationalprogrammen der Nachbarländern Ghana und Benin vergleichbare Entwicklung des PNLUB. Im Jahr 2007 wurde in Zusammenarbeit mit nichtstaatlichen Organisationen (engl.: non governmental organization, NGO) wie „Handicap International“ (HI), Frankreich und der „Deutschen Lepra und Tuberkulose Hilfe e.V.“ (DAHW), Deutschland der erste strategische Fünfjahresplan zur Intensivierung der Diagnostik, Behandlung und epidemiologischer Datenkollektivierung erstellt. Dieses Projekt wurde erweitert und durch den „Plan stratégique PNLUB-LP 2011 – 2015“ fortgesetzt [21]. Die Unterstützung des PNLUB-LP durch die DAHW besteht in der Bereitstellung logistischer Strukturen, von medizinischem Verbrauchs- und Labormaterial, von Medikamenten sowie der Durchführung von Schulungen im Gesundheitssektor. Im Jahr 2007 wurde eine Kooperation zwischen der DAHW Würzburg, dem Regionalbüro der DAHW Togo (DAHWT) und der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der medizinischen Klinik und Poliklinik IV (AITM) des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München initiiert. Somit konnten sämtliche BUD-Verdachtsfälle auf der Grundlage der bereits bestehenden Strukturen und logistischen Voraussetzungen, die vom nationalen TB-Kontrollprogramm und dem PNLUB gemeinsam genutzt wurden, einer systematischen PCR-Diagnostik zugeführt werden [21, 50]. Hierbei wurden die Patienten von speziell ausgebildetem medizinischem Personal („Contrôleur Lèpre-TB-Buruli“, CLT) aufgesucht und in die Behandlungszentren überwiesen. Das Regionalkrankenhaus (Centre Hospitalier Regional [CHR] Maritime), in Tsévié, Region Maritime, Togo wurde 2008 zum Nationalen Referenzzentrum für BUD ernannt; darauf folgte im Jahre 2010 die Etablierung des Bezirkskrankenhauses (Centre Hospitalier Préfectoral, CHP) in Sotouboua, Region Central, Togo zur Außenstelle des Nationalen Referenzzentrums für BUD [50].



Abb. 3: Einfahrt CHR Maritime, Tsévié; Nationales BUD-Referenzzentrum

2 Problemstellung und Zielsetzung

2.1 Problemstellung

Bis zum Jahr 2007 wurden die BUD-Verdachtsfälle aus Togo hauptsächlich klinisch diagnostiziert. Die Anwendung der seit 2004 gemäß WHO empfohlenen achtwöchigen antimykobakteriellen Therapie setzte eine labortechnisch gesicherte Diagnose voraus; neben erheblichem Schulungsbedarf in klinischer Diagnostik und Therapie der BUD, zeigte sich ein ungenügender Zugang zu Standard-Diagnostikmethoden wie der Mikroskopie und PCR.

2.2 Zielsetzung

Die übergeordnete Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Implementierung einer systematischen labortechnischen Diagnostik aller BUD-Verdachtsfälle im Rahmen der 2007 initiierten Kooperation (1.9 & 3.2.1).

Die Ziele dieser Arbeit waren:

1. Aufklärung der Bevölkerung über BUD im Sinne von Sensibilisierungsaktionen in Schulen und an öffentlichen Plätzen.
2. Schulungen von medizinischem Personal in Klinik, Diagnostik und Therapie der BUD.
3. Einführung und Etablierung standardisierter Verfahren zur Probenentnahme und des Probenversandes (DAHWT zur AITM, LMU); (modifiziert nach der im „Kumasi Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine, Kumasi, Ghana“ im Rahmen des EU-geförderten multizentrischen Forschungsprojekts „BURULICO“ durch die Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Klinik und Poliklinik IV des Klinikums der LMU München (AITM) etablierten Methodik [project no. INCO-CT-2005-015476-BURULICO, FP6] [46-48, 76, 86]).
4. Etablierung standardisierter Mikroskopie nach Ziehl-Neelsen in den BUD-Behandlungszentren CHR Maritime Tsévié und CHP Sotouboua, Togo, sowie Durchführung einer externen Qualitätskontrolle (engl.: „external quality assurance“, EQA) der Mikroskopie in der AITM.
5. Laborbestätigung sämtlicher BUD-Verdachtsfälle aus Togo mittels IS2404 PCR in der AITM.
6. Modifizierung der bereits verfügbaren Datenbank (Access 2003, Microsoft Cooperation, Redmond, WA), bereitgestellt durch das EU-geförderte multizentrische Forschungsprojekt „BURULICO“, entsprechend der notwendigen Anforderungen in Togo sowie die Durchführung des kompletten Datenmanagements.
7. Erhebung epidemiologischer Daten zur geographischen Verteilung der BUD innerhalb der Region Maritime, Togo, sowie deren epidemiologische Darstellung und Auswertung mittels Kartenmaterial.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Anwendung	Lieferant
Agarose GTQ	PCR	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Blue Juice 10 x	PCR	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Cell Lysis Solution (CLS)	DNA-Extraktion	Qiagen, Hilden, Deutschland
DNA Hyd	DNA-Extraktion	Qiagen
Entmineralisiertes Wasser	PCR	Anlage im Haus
Ethanol 70%	DNA-Extraktion	Carl Roth
Ethanol 96%	DNA-Extraktion	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethidium Bromid 1%	PCR	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Gel Red Nucleic Acid Stain	PCR	Biotium, Hayward, USA
Glykogen 20 mg/ml	DNA Extraktion	AppliChem
Hypochlorid (NaOCl x H ₂ O)	Flächenreinigung	Nalgene, 4000 Roskilde, Dänemark
Isopropanol (2-Propanal)	DNA-Extraktion	Carl Roth
Protein Precipitation Solution (PPS)	DNA-Extraktion	Qiagen
TBE Puffer 10%	PCR	Carl Roth

Tab. 1: Chemikalien

3.1.2 Enzyme

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

Tab. 2: Enzyme

3.1.3 Nukleotide und Nukleinsäuren

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller/Lieferant
dNTP's	IS2404 PCR	Applied Biosystems
100 bp DNA-Leiter	Gel-Elektrophorese	Invitrogen
Primer Mu5 (Sequenz 5'-3'): AGC GAC CCC AGT GGA TTG GT	Sense Primer, IS2404 Amplifikation	TibMolbiol, Berlin, Deutschland
Primer Mu6 (Sequenz 5'-3'): CGG TGA TCA AGC GTT CAC GA	Antisense Primer, IS2404 Amplifikation	TibMolbiol

Tab. 3: Nukleotide und Nukleinsäuren

3.1.4 Reagenzsystem

Bezeichnung	Anwendung	Lieferant
Genomic DNA Purification Kit	DNA Extraktion	Qiagen
Ampli Taq Gold with Gene Amp	IS2404 PCR	Applied Biosystems
Buffer II	IS2404 PCR	Applied Biosystems
MgCL 2 Solution	IS2404 PCR	Applied Biosystems

Tab. 4: Reagenzsysteme

3.1.5 Geräte

Bezeichnung	Modell/Seriennummer	Hersteller
Arbeitsbank ClanLaf, steril	VRF 1206	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Drucker	LBP-800	Canon, Krefeld, Deutschland
Gel-Kammer	Model 401216	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Eisflockenbereiter	AF 80 AS, DD6798	Scotsman, Mailand, Italien
Inkubator	Thermomixer HLC, HTML-133-3-145	HAEP LABOR Consult
Kühlschrank	KT 1414; Model 760024	Liebherr, Biberach, Deutschland
Kühlschrank	KS 155 TA 1F	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Kühlschrank	KG KT RR 16A	Siemens, München, Deutschland
Mikroskop	Standard 20, 4010003104	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Mikrowelle	8017 E	Privileg
Netzteil (Gelkammer)	Power Pack 300	BioRad, München, Deutschland
Personal Computer (PC)		UniEquip, Martinsried, Deutschland
Pipetten, 10µl		Eppendorf
Pipetten, 20µl, 200µl, 1ml	Pipetman	Gilson, Bad Camberg, Deutschland
Thermocycler	Personalcycler, SN 9707120	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermocycler	UNO II, SR 9707155	Biometra
Thermomixer	MKR 13	HLC, BIOTECH, Deutschland
Tiefkühlschrank	KS155TA	AEG, Nürnberg, Deutschland
Tiefkühlschrank	GP 1456 Mod. 461494	Liebherr,
Tiefkühlschrank	GSS 3666;	Liebherr
Tiefkühlschrank	GS 15025,	Liebherr
Ultraviolett Transilluminator	UT 1150207	UniEquip
Vortex	Assistent Reamix 2789	Reamix, Sondheim, Deutschland
Vortex	Vortex Genie, K-550-GE	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge pico 241715	Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland

Tab. 4: Geräte

3.1.6 Weiteres Labormaterial

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller/Lieferant
Falkon-Gefäße 20ml, 50ml	DNA-Extraktion	Corning, NY 14831, USA
Handschuhe (Safe Skin PFE)	DNA-Extraktion, PCR	Kimberly-Clark, Koblenz, Deutschland
Handschuhe (Safe Skin Nitrile)	PCR	Kimberly-Clark
Mikroschraubröhrchen 2,0 ml	Transport von diagnostischem Material, DNA-Extraktion	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
Mikro-Tube 0,2 ml	PCR	Kisker Biotech
Pipettenspitzen, Safe Seal Tips; 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	DNA-Extraktion, PCR	Kisker Biotech
Reaktionsgefäße 1,5 ml	DNA-Extraktion	Kisker Biotech
Sterile Einmal-Skalpelle Gr.10	DNA-Extraktion	Braun, Melsungen, Deutschland
Sterile Einmal-Pinzetten	DNA-Extraktion	Servoprax, Wese, Deutschland

Tab. 5: Labormaterial

Außerdem: Eisaufbewahrungsbox, Laborabfallbehälter, Papierhandtücher, Laborwecker, Proben- und Reaktionsgefäßständer sowie Händedesinfektionsmittel.

3.1.7 Material zur standardisierten Probenabnahme in Togo

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller/Lieferant
Abstrichbesteck, REF 421 180	Wundabstrich	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Biopsie Hautstanze 3mm	Stanzbiopsie	Kai Industries, Solingen, Deutschland
CLS	Transportmedium für diagnostisches Probenmaterial	Qiagen
Einmalhandschuhe	Untersuchung, Probenabnahme	Paul Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Etiketten selbstklebend	Kennzeichnung der Transportgefäße für Probenmaterial	Herma, Filderstadt-Bonlanden, Deutschland
Händedesinfektionsmittel	Untersuchung, Arbeitshygiene	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
Kanülen (21 G x1,5)	Lokalanästhesie, Feinnadelaspiration	Holden Medical, Lelystad, Niederlande
Lokalanästhetikum Lidocain	Stanzbiopsie	Braun
Maßband selbstklebend	Dokumentation	Exakta-Meßwerkzeuge Herma, Bayreuth, Deutschland
Mikroschraubröhrchen 2,0 ml	Transport des Probenmaterials	Kisker Biotech
Objektträger	Mikroskopie	Meade Instrument Europe, Rhede, Deutschland
Spritzen 5ml, 10 ml	Lokalanästhesie, Feinnadelaspiration	Holden Medical

Tab. 6: Material zur Probenabnahme in Togo

Außerdem: Verbandsmaterial, Bleistifte, Kugelschreiber, Transportbox für Objektträger, Digitalkamera und Müllbeutel.

3.1.8 Diagnostisches Probenmaterial

Die verwendeten Proben sind unter Punkt 3.2.5 ff. aufgeführt.

3.2 Methoden

3.2.1 Ablauf

Zu Projektbeginn im September 2007 wurde ein Ablaufplan zwischen der DAHWT, deren lokalen Partnern und der AITM München mit folgendem Inhalt definiert:

1. Schulungen für medizinisches Personal und der „Contrôleurs Lépre-TB-Buruli“ (CLT) in Klinik, Diagnostik, Therapie (chirurgisch - nicht chirurgisch) der BUD unter Mitwirkung der AITM.
2. Etablierung und Supervision standardisierter Vorgehensweisen von Probenentnahme, Probentransport und Dokumentation durch die AITM.
3. Durchführung von Sensibilisierungsaktionen zur Aufklärung der Bevölkerung an öffentlichen Plätzen und Schulen in Dörfern der Regionen Maritime und Central.
4. Aufklärung der Patienten über die Notwendigkeit der Entnahme von diagnostischen Proben zur PCR-Diagnostik in der AITM, sowie der Verwendung der erhobenen Daten in pseudonymisierter Form.
5. Erfassung anamnestischer, epidemiologischer und klinischer Daten mittels studienspezifischer Formulare und Identifikationschiffren (Abb.: 8 – 15). Datenerfassung und Archivierung mittels einer Modifikation der bestehenden BURULICO-Datenbank, Bearbeitung und Auswertung in elektronischer Form (Access-, Excel- Microsoft) durch die AITM.
6. Mikroskopie: zeitnahe Durchführung in lokalen Laboren (CHR Maritime, Tsévié, CHP Sotouboua); Durchführung der externen Qualitätskontrolle (EQA) in der AITM.
7. IS2404 PCR-Diagnostik (von allen BUD-Verdachtsfällen): Durchführung in der AITM
8. Vereinbarung zum Austausch pseudonymisierter Daten zwischen AITM, DAHWT, PNLUB-LP Togo und der WHO.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte ich mich während zweier Aufenthalte von Februar bis März sowie im Oktober des Jahres 2008 im CHR Maritime, Tsévié, Region Maritime, Togo an der Koordination und Durchführung der unter 1, 2, 3, 4 und 5 genannten Aufgaben aktiv beteiligen. Die der AITM zugewiesenen Punkte (5, 6, 7, 8) wurden von mir ausgeführt.

3.2.2 Ethische Voraussetzungen

Das seit 2007 bestehende Rahmenabkommen zwischen der DAHWT und dem Togoischen Gesundheitsministerium („Ministère de la Santé“) (siehe auch 1.9) schließt sowohl Labordiagnose als auch Behandlung von BUD-Verdachtsfällen und -Patienten ein. Alle im Rahmen der Diagnosestellung und Therapie durchgeführten Tätigkeiten (inklusive Abnahme diagnostischer Proben) sind Bestandteil des regulären klinischen Managements und bedurften daher keiner gesonderten ethischen Freigabe durch die Togoische Ethikkommission („Comité de Bioéthique pour la

Recherche en Santé, Université de Lomé, Togo“). Entsprechend der landesüblichen Praxis wurden von 2007 bis 2008 die Patienten, oder im Falle von Minderjährigen auch deren gesetzliche Vertreter, über die Notwendigkeit der Probenentnahmen zur Diagnostik wie auch die Verwendung der Daten in pseudonymisierter Form mündlich aufgeklärt. Ab 2009 wurden durch das Nationalprogramm PNLUB Patienteneinverständniserklärungen eingeführt, die von den Patienten oder deren gesetzlichen Vertretern mit Unterschrift oder Daumenabdruck (bei Analphabeten) unterzeichnet wurden. Einzelheiten zur Probenabnahme und deren weiterer Verwendung (pseudonymisiert) zur Diagnostik (AITM) und späteren Publikationen (DAHWT, AITM, WHO) wurden den Patienten bzw. deren Vertretern vom medizinischem Personal in der jeweiligen Landessprache bzw. in den regionalen Dialekten erklärt (Abb.: 8 - 10).

3.2.3 Einschluss- und Ausschlusskriterien

Alle klinischen BUD-Verdachtsfälle, die ihr Einverständnis zur Probenabnahme, Datenerfassung, Datenarchivierung und deren weiterer Verwendung gegeben hatten, wurden in die Studie aufgenommen. Es gab keine Einschränkung bzgl. der Erkrankungsdauer, der Krankheitsausprägung (einzelne oder multiple Läsionen), des Alters oder des Geschlechts. Die Ausschlusskriterien waren das fehlende Einverständnis der Patienten bzw. der gesetzlichen Vertreter und klinisch eindeutige Differenzialdiagnosen.

3.2.4 Rekrutierung der BUD-Verdachtsfälle

Die Operateure der Region, das medizinische Personal des CHR Maritime, Tsévié, CHP Sotouboua sowie die in den Dörfern tätigen „Contrôleurs Lépre-TB-Buruli“ (CLT's) des PNLUB, ab 2010 des erweiterten PNLUB-LP, wurden in insgesamt zwanzig praktischen und acht theoretischen Fortbildungen zur Klinik und Therapie der BUD während der Einsätze der AITM (2007 - 2010) in Togo geschult. Des Weiteren fanden seit September 2007 vierteljährlich durch das PNLUB koordinierte Sensibilisierungsaktionen für die CLT's des PNLUB und die Belegschaft des BUD-Referenzzentrums CHR Maritime, Tsévié statt. Klinisch diagnostizierte Verdachtsfälle wurden von den CLT's an die Behandlungszentren (CHR Maritime, Tsévié, CHP Sotouboua) bzw. an die medizinischen Versorgungsstützpunkte („Unité de Soins Péripherique, USP“) zur diagnostischen Probenabnahme und Behandlung überwiesen („active case finding“). Außerdem stellten sich Patienten selbstständig in den Behandlungszentren vor („passive case finding“).

3.2.5 BUD Verdachtsfälle und diagnostisches Probenmaterial

3.2.5.1 Etablierung von standardisierten Probenentnahme-Sets

Im Zuge der Einführung der standardisierten Probenentnahme, wurden während meines ersten Aufenthaltes in Togo von Februar bis März 2008 einheitliche Probenentnahme-Sets konzipiert, deren Inhalt den Anforderungen angepasst wurde; somit unterschieden sich die Sets für den Einsatz im Operationsaal/Behandlungszimmer von jenen, die im Gelände auf sog. „case-finding-tours“ verwendet wurden. Die Plastiktransporttaschen wurden so ausgewählt, dass die Formulare zusammen mit den zugehörigen Proben transportiert werden konnten. (Tab.: 7; Abb.: 16)

Material	Stück/OP	Stück/Gelände
Inhalt		
Formulare	BU 01, 02; UB 03; Data entry form, Togo, Einverständniserklärung	BU 01, 02; UB 03; Data entry form, Togo, Einverständniserklärung
Mikroschraubröhrchen (CLS 700 µl)	6 (incl. 1 Ersatz)	4 (incl. 1 Ersatz)
Wundabstrichbesteck	2	2
Kanülen (21 gauge)	4 (incl.1 Ersatz)	3 (incl. 1 Ersatz)
Spritzen (10 ml)	3	3
Objektträger	2	2
Selbstklebende Etiketten	8	8
30 cm selbstklebendes, beschriftbares Maßband	1	1
5 ml Lokalanästhetikum (Wirkstoff: Lidocain)	3	1

Tab. 7: Inhalt standardisierter Probeabnahme-Sets

3.2.5.2 Art und Anzahl der diagnostischen Proben pro BUD-Verdachtsfall

Entsprechend der Läsionsart wurde eine Mindestanzahl von diagnostischen Proben pro Verdachtsfall vereinbart. Wundabstriche und Feinnadelaspirate (FNA) wurden sowohl für die mikroskopische als auch für die PCR-Diagnostik abgenommen. Stanzbiopsien (3mm) und chirurgisch exzidierte Gewebe (Biopsien) wurden aufgrund der Invasivität der Probenentnahme nur für die PCR-Diagnostik verwendet. (Tab.: 8)

Art der Läsion	Wundabstrich	FNA	Stanzbiopsie (3 mm)	Chirurgisch gewonnenes Gewebe
Nicht-ulzerativ	-	2	1	1
Ulzerativ	2	2	1	1

Tab. 8: Mindestanzahl diagnostischer Proben pro Läsion und BUD-Verdachtsfall

3.2.5.3 Standardisierte Probenentnahme

Das diagnostische Probenmaterial wurde bei nicht-ulzerativen Läsionen aus dem Zentrum, bei ulzerativen Läsionen aus dem Randbereich von nekrotischem zu makroskopisch gesund erscheinendem Gewebe gewonnen [46, 47, 87]. Bei nicht-ulzerativen Läsionen wurden FNA's und Biopsien aus der Mitte der Läsion bzw. erhobenen Stelle entnommen [46-48]. Bei ulzerativen Läsionen wurden Wundabstriche durch zirkuläres Umfahren der unterminierten Wundränder mit dem Wundabstrichtupfer, FNA's und Biopsien aus dem Übergang von nekrotischem zu makroskopisch gesund erscheinendem Gewebe unter Mitnahme des subkutanen Fettgewebes

entnommen [46-48, 86]. Alle Probenentnahmen außer der Wundabstriche und FNA's wurden unter Anwendung von Lokalanästhesie durchgeführt [46, 48, 87].

3.2.5.4 Konservierung und Transport der diagnostischen Proben

3.2.5.4.1 Mikroskopie

Wundabstrich: Das Material wurde unverzüglich auf die Objektträger (OT) aufgebracht.

FNA: Ein Tropfen des Wundaspirats wurde auf den OT gebracht und mit Hilfe eines zweiten OT unverzüglich ein Ausstrich angefertigt (siehe 3.2.6.1.1).

Die mit Patientenmaterial präparierten und mit Patienten-ID gekennzeichneten OT wurden nach Lufttrocknung staubfrei im Labor oder bei Abnahme im Feld in Transportboxen für mikroskopische Präparate aufbewahrt.

3.2.5.4.2 PCR

Die Wundabstriche, FNA's, Stanzbiopsien und operativ exzidiertes Gewebe für die PCR-Diagnostik wurden jeweils sofort nach Abnahme in ein separates, mit Patienten-ID gekennzeichnetes und mit 700 µl CLS gefülltes Mikroschraubröhrchen überführt.

3.2.5.5 Art und Herkunft der diagnostischen Proben

Die untersuchten Patientenproben von 202 BUD-Verdachtsfällen stammten aus dem Nationalen Referenzzentrum für BUD, CHR Maritime, Tsévié (BUD-Verdachtsfälle n=187), dem Bezirkskrankenhaus CHP Sotouboua (BUD-Verdachtsfälle n=14) und dem peripheren Versorgungszentrum „Unité de Soins Périphérique“ (USP) Agbetiko (BUD-Verdachtsfall n=1). 231 OT für die mikroskopische AFB-Diagnostik (Wundabstrich: n=116; FNA: n=115) wurden in CHR und CHP, Togo untersucht. Insgesamt wurden 549 diagnostische Proben mittels IS2404 PCR-Diagnostik (Wundabstrich: n=152; FNA: n=167; Stanzbiopsie: n=179; operativ exzidiertes Gewebe: n=51) in der AITM analysiert. (Tab.: 9)

Läsion	Behandlungs- zentrum	Wund- abstrich		FNA		Stanz Biopsie		Operativ exzidiertes Gewebe	
Nicht -ulzerativ		MIC	PCR	MIC	PCR	MIC	PCR	MIC	PCR
	CHR Maritime, Tsévié	NV	NV	23	49	NV	50	NV	3
	CHP Sotouboua	NV	NV	NV	1	NV	NV	NV	2
	USP Agbetiko	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
	Summe			23	50		50		5
Ulzerativ		MIC	PCR	MIC	PCR	MIC	PCR	MIC	PCR
	CHR Maritime, Tsévié	115	142	92	111	NV	121	NV	44
	CHP Sotouboua	1	9	NV	5	NV	6	NV	2
	USP Agbetiko	NV	1	NV	1	NV	2	NV	NV
	Summe	116	152	92	117	NV	129	NV	46
Gesamtsumme		116	152	115	167	NV	179	NV	51

Tab. 9: Anzahl der analysierten Proben pro Testverfahren und Herkunft

Quelle:[50]

Legende: NV, nicht vorhanden; MIC, mikroskopische Untersuchung zur Detektion säurefester Stäbchen; PCR, Polymerase Kettenreaktion IS2404 PCR)

3.2.5.6 Datenerfassung und -archivierung

Die Daten zu den diagnostischen Proben wurden in einem projektspezifischen Datenerhebungsformular durch das medizinische Personal erfasst („data entry form, Togo“, siehe Anhang, Abb.: 11). Die WHO Formulare wurden zur Erfassung klinischer (UB01 I & II), therapeutischer (UB02) und sozio-epidemiologischer (UB03) Daten verwendet (s. Anhang, Abb.: 12 – 15). Die Papierformulare (BU01, UB02, UB03, „data entry form, Togo“) dienten dem Informationstransfer zwischen den Behandlungszentren und der AITM; die Originale verblieben in den medizinischen Akten der Behandlungszentren in Togo. Alle erhobenen Daten, Therapieverläufe und Ergebnisse der Labordiagnostik wurden in pseudonymisierter Form in der Datenbank der AITM (siehe 2.2: Ziel 4) archiviert.

3.2.5.7 Datenmanagement

Die Ergebnisse der Diagnostiktests wurden den togoischen Behandlungszentren während des Studienverlaufs schnellstmöglich übermittelt. Die Auswertung anamnestischer, sozioepidemiologischer, klinischer und labordiagnostischer Daten und Ergebnisse wurde mittels Stata software, Version 9.0 (Stata Corporation, College Station, TX) sowie EpiInfo, Version 3.3.2 (Centers

for Disease Control and Prevention, CDC, Atlanta, GA) in der AITM durchgeführt. Die Endbefunde der togoischen Labore und der AITM wurden der DAHW, dem PNLUB-LP sowie der WHO für statistische Zwecke zur Verfügung gestellt (3.2.1).

3.2.6 Angewandte Labormethoden zum Nachweis von *M. ulcerans*

3.2.6.1 Mikroskopie

Die Mikroskopie wurde primär zum Nachweis säurefester Stäbchen aus diagnostischem Patientenmaterial (Wundabstrich, FNA) in den togoischen Behandlungszentren angewandt [50, 87]. Die hausinternen Labore der Behandlungszentren CHR Maritime, Tsévié und CHP Sotouboua dienten als lokale Diagnostiklabore, die AITM als externes Referenzlabor.

3.2.6.1.1 Ziehl-Neelsen Färbung

Anleitung zur Färbung nach Ziehl-Neelsen siehe Anhang, 11.2, Tabelle 27 sowie Abbildung 20.

3.2.6.1.2 Beurteilung der Mikroskopie

Pro OT wurden - analog zur TB-Diagnostik - 100 Gesichtsfelder in 100-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop begutachtet und entsprechend folgendem Beurteilungsschema (Tab.: 10) bewertet:

Grading	Anzahl der AFB pro Gesichtsfelder
+++ (positiv)	> 10 AFB/Gesichtsfeld
++ (positiv)	1 – 10 AFB/Gesichtsfeld
+ (positiv)	10 – 99 AFB/100 Gesichtsfelder
Exakte Anzahl der AFB (positiv)	1 – 9 AFB/100 Gesichtsfelder
negativ	Kein AFB/100 Gesichtsfelder

Tab. 10: Beurteilungsschema für AFB-Mikroskopie

Quelle Tab. 10: Sanjay Rajpal, V.K.D., *Sputum grading as predictor of treatment outcome in pulmonary tuberculosis*. *Ind.J Tub.*, 2002: p. 139 - 143[88].

3.2.6.2 PCR-Diagnostik

Die Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient dem Nachweis von spezifischen DNA-Sequenzen aus einem heterogenen Nukleinsäuregemisch mittels Amplifikation (Vervielfältigung der Sequenzen).

3.2.6.2.1 Nukleinsäurepräparation aus diagnostischem Patientenmaterial

Die Gesamt-DNA-Extraktion aus diagnostischem Probenmaterial wurde entsprechend dem modifizierten Protokoll aus dem „Gentra Puregene Handbuch der Fa. Qiagen“ durchgeführt [89]. Die verwendeten Reagenzien exklusive Lysozym, Proteinase K, Glykogen, Isopropanol und Ethanol 70% waren im Testkit enthalten (3.1.5). Anleitung zur Nukleinsäurepräparation im Anhang, 11.3, Tabelle 28.

3.2.6.2.2 Lagerung der DNA Extrakte

Kurzzeitlagerung (max. 7 d): In Schraubröhrchen mit Dichtungsring im Kühlschrank bei 4°C.
Langzeitlagerung (Wochen bis Jahre): In Schraubröhrchen mit Dichtungsring tiefgefroren bei – 20°C.

3.2.6.2.3 Konventionelle IS2404 PCR

Die IS2404 PCR weist im heterogenen DNA Extrakt der zu analysierenden Patientenprobe die Insertionssequenz (IS) 2404 (492 bp) nach, die in klinischen Proben hochspezifisch für *M. ulcerans* ist [71, 72, 90, 91].

Die IS2404 PCR wurde als konventionelle Amplifikationsreaktion mit anschließender Agarose Gel-Elektrophorese durchgeführt.

Die Amplifikation wurde in einem Thermocycler nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Initiale Denaturierungsphase: 5 min. bei 95°C, dann folgten 40 Zyklen: Denaturierung (95°C, 10 sec), Primeranlagerung (engl.: „annealing“, 58°C, 10 sec) und Extension (engl.: „elongation“, 72°C, 30 sec).
Reaktionsende nach terminaler Extensionsphase (72°C, 10 min) (Endtemperatur: 8°C).

Zusammensetzung des Reaktionsendvolumens (20µl) für eine IS2404 PCR-Reaktion:

PCR Puffer (100 mM Tris-HCL, 500 mM KCL, pH 8,3), 2,5 mM MgCl², 200µM je des Desoxy-Nukleotriphosphats (dNTP), 10 pmol je der Primer Mu5 (Sequenz 5`-3`: AGC GAC CCC AGT GGA TTG GT) und Mu6 (Sequenz 5`-3`: CGG TGA TCA AGC GTT CAC GA), 1 U Ampli Taq-Gold DNA Polymerase, aqua ad injectabilia sowie 2µl (10%) der gemäß 3.2.6.2.1 präparierten Nukleinsäuren.

3.2.6.2.4 Ergebnisbeurteilung mittels Gelelektrophorese

Die Amplifikate wurden in einem mit Ethidiumbromid bzw. Gel-Red gefärbten, 1,5%-igen Agarose Gel, unter Verwendung von Gelladepuffer als distinkte Banden bei UV Licht sichtbar gemacht. Eine positive PCR-Testreaktion zeigte im Gegensatz zur negativen Testreaktion, eine distinkte Bande (492 bp) auf.

3.2.6.2.5 Interne Qualitätskontrolle

Bei der Durchführung jeder IS2404 PCR wurden interne Qualitätskontrollen - Negativkontrollen (negative Extraktionskontrolle, negative „non template“ Kontrollen), Inhibitionskontrollen und Positivkontrollen - mitgeführt.

3.2.7 Qualitätskontrolle

3.2.7.1 Externe Qualitätskontrolle

Die externe Qualitätskontrolle (engl.: external quality assurance, EQA) evaluierte die Laborleistung des Testlabors. Für die Diagnostikmethode der ZN-Mikroskopie dienten die togoischen hausinternen Labore der Behandlungszentren CHR Maritime, Tsévié und CHP Sotouboua als lokale Testlabore, die AITM als supervidierendes Referenzlabor. Die zu untersuchenden OT wurden in unregelmäßigen Zeitabständen der AITM zugesandt und von mir verblindet (engl.: „blinded re-checking“) entsprechend 3.2.6.1.2 gelesen und beurteilt. Die konkordanten Ergebnisse wurden als Endergebnisse anerkannt, bei diskordanten Ergebnissen wurde zu deren Verifizierung, ein/e weitere/r erfahrene/r UntersucherIn zur weiteren Untersuchung hinzugezogen. Im Falle

persistierender Diskordanz nach wiederholter Untersuchung der OT wurde das finale Ergebnis des Referenzlabors (AITM) übernommen.

4 Ergebnisse

4.1 Durchführung der unter 3.2.1 geplanten Studie

Die vorliegende Diagnostikstudie konnte in dem Beobachtungszeitraum von September 2007 bis August 2010 unter Einhaltung der unter 3.2.2 und 3.2.3. erläuterten Ethik- und Einschlussbedingungen durchgeführt werden. (Abb.: 8 – 10)

Während meiner persönlichen Einsätze (Februar bis März 2008 und Oktober 2008) in der Region Maritime wurde das medizinische Personal durch zwei theoretische und vier praktische Lehrgänge in die BUD-Thematik eingearbeitet. (Abb.: 17 - 19)

4.1.1 Patientenrekrutierung

Von ursprünglich 211 konnten insgesamt 202 klinische BUD-Verdachtsfälle entsprechend der Einschlusskriterien gemäß 3.2.3 in diese Studie eingeschlossen werden.

4.1.2 Epidemiologische Basisdaten der BUD-Verdachtsfälle

4.1.2.1 Herkunft der BUD-Verdachtsfälle

Die 202 klinischen BUD-Verdachtsfälle stammten aus den Regionen Central (n=16), Maritime (n=184) und Plateaux (n=2). Die eingemeindeten „Sous-préfectures“ Afanyan (Lacs) und Avé (Zio) wurden in die Aufzählung integriert. Siehe dazu 11.1, Tab.: 26: „Anzahl und Herkunft der BUD-Verdachtsfälle“ im Anhang.

4.1.2.2 BUD-Verdachtsfälle pro Beobachtungsperiode und Kalenderjahr

Die dreijährige Beobachtungsdauer wurde für die Datenanalyse in drei gleiche Beobachtungsperioden (je 12 Monate) und in Kalenderjahre aufgeteilt. (Tab.: 11 & 12)

4.1.2.2.1 BUD-Verdachtsfälle pro Läsionsart und Beobachtungsperiode

Die Anzahl der rekrutierten BUD-Verdachtsfälle mit nicht ulzerativen Läsionen nahm im Laufe der dreijährigen Gesamtbeobachtungsdauer von 14,3% (12/84) in der ersten (September 2007 – August 2008), auf 19,7% (13/66) in der zweiten (September 2008 – August 2009) und 50% (26/52) in der dritten (September 2009 – August 2010) Beobachtungsperiode zu, während sich die Anzahl der rekrutierten BUD-Verdachtsfälle mit ulzerativen Läsionen von 85,7% (72/84) in der ersten (September 2007 – August 2008), auf 80,3% (53/66) in der zweiten (September 2008 – August 2009) auf 50,0% (26/52) in der dritten (September 2009 – August 2010) Beobachtungsperiode reduzierte. Insgesamt wurden 51 BUD-Verdachtsfälle mit nicht-ulzerativen Läsionen (25,2%; 51/202) und 151 BUD-Verdachtsfälle mit ulzerativen Läsionen (74,7%, 151/202) rekrutiert. (Tab.: 11)

Beobachtungsperiode	Läsion		BUD-Verdachtsfälle
	Nicht-ulzerativ	Ulzerativ	
I. September 2007 - August 2008	12 (12/84 [14,3%])	72 (72/84 [85,7%])	84 (84/202 [41,6%])
II. September 2008 - August 2009	13 (13/66 [19,7%])	53 (53/66 [80,3%])	66 (66/202 [32,7%])
III. September 2009 - August 2010	26 (26/52 [50,0%])	26 (26/52 [50,0%])	52 (52/202 [25,7%])
Gesamt	51 (51/202 [25,2%])	151 (151/202 [74,7%])	202

Tab. 11: BUD-Verdachtsfälle pro Beobachtungsperiode

4.1.2.2.2 BUD-Verdachtsfälle pro Läsionsart und Kalenderjahr

Die Anzahl der rekrutierten BUD-Verdachtsfälle mit nicht ulzerativen Läsionen nahm im Laufe der dreijährigen Gesamtbeobachtungsdauer von 16,6% (4/24) in 2007, auf 14,5% (12/83) in 2008, auf 28,6% (16/56) in 2009 und 48,7% (19/39) in 2010 zu, während sich die Anzahl der rekrutierten BUD-Verdachtsfälle mit ulzerativen Läsionen von 83,3% (20/24) in 2007, auf 85,5% (71/83) in 2008, auf 71,4% (40/56) in 2009 und 51,3% (20/39) in 2010 zu reduzierte. (Tab.: 12)

Jahr	Läsion		BUD-Verdachtsfälle
	Nicht-ulzerativ	Ulzerativ	
2007	4 (4/24 [16,6%])	20 (20/24 [83,3%])	24 (24/202 [11,8%])
2008	12 (12/83 [14,4%])	71 (71/83 [85,5%])	83 (83/202 [41,1%])
2009	16 (16/56 [28,6%])	40 (40/56 [71,4%])	56 (56/202 [27,7%])
2010	19 (19/39 [48,7%])	20 (20/39 [51,3%])	39 (39/202 [19,3%])
Gesamt	51 (51/202 [25,2%])	151 (151/202 [74,7%])	202 (202/202 [100%])

Tab. 12: BUD-Verdachtsfälle pro Kalenderjahr

4.1.2.3 Erkrankungsdauer der BUD-Verdachtsfälle pro Beobachtungsperiode und Kalenderjahr

4.1.2.3.1 Erkrankungsdauer der BUD-Verdachtsfälle pro Beobachtungsperiode

Die Erkrankungsdauer der BUD-Verdachtsfälle mit nicht-ulzerativen Läsionen reduzierte sich von 190,3 d (I. Beobachtungsperiode) auf 23,6 d (III. Beobachtungsperiode) und bei BUD-Verdachtsfällen mit ulzerativen Läsionen von 776,6 d (I. Beobachtungsperiode) auf 294,2 d (III. Beobachtungsperiode) innerhalb der dreijährigen Gesamtbeobachtungszeit von September 2007 bis August 2010. Die durchschnittliche Reduktion der Erkrankungsdauer in der Gesamtbeobachtungszeit belief sich auf 167 Tagen bei den BUD-Verdachtsfällen mit nicht-ulzerativen Läsionen und auf 482 Tagen bei den BUD-Verdachtsfällen mit ulzerativen Läsionen. (Tab.: 13)

Beobachtungsperiode	Erkrankungsdauer der BUD-Verdachtsfälle bis zur ersten Vorstellung in Tagen*	
	Nicht-ulzerative Läsion	Ulzerative Läsion
I. September 2007 – August 2008	Range: 28 – 720 d; (Σ : 2284, n=12) Ø: 190,3 d	Range: 7 - 5400 d; (Σ : 55912, n=72) Ø: 776,6 d
II. September 2008 – August 2009	Range: 5 – 180 d; (Σ : 695, n=13) Ø: 53,5 d	Range: 3 – 3510 d; (Σ :18667, n=53) Ø: 352,2 d
III. September 2009 – August 2010	Range: 4 – 56 d; (Σ : 613, n=26) Ø: 23,6 d	Range: 7 – 2520 d; (Σ :7649, n=26) Ø: 294,2 d
September 2007 – August 2010	Ø: 70,4 d (Σ: 3592, n=51)	Ø: 544,6 d (Σ: 82228, n=151)

Tab. 13: Erkrankungsdauer der BUD-Verdachtsfälle pro Beobachtungsperiode

Legende: * Die Angaben beziehen sich auf den Range der dokumentierten Zeitangaben der BUD-Verdachtsfälle (n=x) pro Läsion pro Beobachtungsperiode.

4.1.2.3.2 Erkrankungsdauer der BUD-Verdachtsfälle pro Kalenderjahr

Die Erkrankungsdauer der BUD-Verdachtsfälle mit nicht ulzerativen Läsionen verkürzte sich durchschnittlich von 246 d (2007) auf 19,4 d (2010) und bei den BUD-Verdachtsfällen mit ulzerativen Läsionen durchschnittlich von 919,5 d (2007) auf 108,7 d (2010) im Verlauf der Gesamtbeobachtungszeit. (Tab.: 14)

Beobachtungsjahr	Erkrankungsdauer der BUD-Verdachtsfälle bis zur ersten Vorstellung in Tagen*	
	Nicht-ulzerative Läsion	Ulzerative Läsion
2007	Range: 28 – 720 d; (Σ : 984, n=4) Ø: 246 d	Range: 21 – 3900 d; (Σ :18391, n=20) Ø: 919,5 d
2008	Range: 14 – 360 d; (Σ : 1734, n=12) Ø: 144,5 d	Range: 7 – 5400 d; (Σ :47854, n=71) Ø: 674 d
2009	Range: 7 – 90 d; (Σ : 506, n=16) Ø: 31,6 d	Range: 3 – 3240 d; (Σ : 14491, n=40) Ø: 362,3 d
2010	Range: 4 – 56 d; (Σ : 368, n=19) Ø: 19,4 d	Range: 7 – 720 d; (Σ : 2175, n=20) Ø: 108,7 d
2007 - 2010	Ø: 70,4 d (Σ: 3592, n=51)	Ø: 549,1 (Σ: 82911, n=151)

Tab. 14: Erkrankungsdauer der BUD-Verdachtsfälle pro Kalenderjahr

Legende: *Die Angaben beziehen sich auf den Range der dokumentierten Zeitangaben der BUD-Verdachtsfälle (n=x) pro Läsion pro Kalenderjahr.

4.1.3 Etablierung der standardisierten Verfahren zur Probenabnahme

Standardisierte Verfahren zur Probenentnahme [46-48, 76, 86] konnten erfolgreich etabliert werden.

4.1.3.1 Schulungen zur standardisierten Probenabnahme

Das Verfahren der standardisierten Probenabnahme (3.2.5.1, 3.2.5.2, 3.2.5.3) konnte mit Durchführung von insgesamt acht theoretischen Schulungen (Region Central [n=2]; Region Maritime [n=6]) und 20 supervidierten Praxisschulungen (Region Maritime) erfolgreich etabliert werden (Abb.: 18, 19). Während meiner persönlichen Einsätze vor Ort von Februar bis März und im Oktober 2008 konnte ich aktiv bei zwei theoretischen (Powerpoint Präsentationen, MS 2003) und bei vier praktischen Schulungen (Diagnostik- und Probenabnahmeschulungen während der durchgeführten „field trips“ sowie in den Behandlungseinheiten vor Ort) mitwirken (Abb.: 17, 18, 19). Dabei wurden sämtliche Aspekte der klinischen Diagnose und die Techniken der standardisierten Probenabnahme mittels „on-site trainings“ erfolgreich geschult und re-evaluiert.

4.1.3.2 Rücklauf der standardisierten Probenabnahme-Sets

58,9% (119/202) der Probeabnahme-Sets der 202 BUD-Verdachtsfälle enthielten die zu Studienbeginn vereinbarte Proben-Mindestanzahl (siehe 3.2.5.1; 3.2.5.2). (Tab.: 15)

Anzahl der Probeabnahme Sets nach Läsion/Behandlungszentrum pro BUD-Verdachtsfall

Behandlungszentrum	Art der Läsion	Unvollständige „specimen sets“ pro BUD-Verdachtsfall	Vollständige „specimen sets“ pro BUD-Verdachtsfall
CHR, Maritime Tsévié	Nicht-ulzerativ (n=51)	6 (6/49 [12,2%])	43 (43/49 [87,8%])
CHP, Sotouboua		2 (2/2 [100%])	0 (0/2 [0%])
USP, Agbetiko		0 (0/0 [0%])	0 (0/0 [0%])
CHR, Maritime Tsévié	Ulzerativ (n=151)	66 (66/138 [47,8%])	72 (72/138 [52,2%])
CHP, Sotouboua		9 (9/12 [75,0%])	3 (3/12 [25,0%])
USP, Agbetiko		0 (0/1 [0%])	1 (1/1 [100%])
Total	202	83 (83/202 [41,1%])	119 (119/202 [58,9%])

Tab. 15. Anzahl der standardisierten Probeabnahmesets pro BUD-Verdachtsfall

4.1.4 Untersuchungsergebnisse der Labordiagnostik aus Probenmaterial

4.1.4.1 Positivitätsraten der getesteten Proben

Mikroskopie: In 29,1% (67/231) der in Togo untersuchten mikroskopischen Präparaten wurden säurefeste Stäbchen nachgewiesen (Wundabstrich: n=27/116 [23,3%]; FNA: n=40/115 [34,8%]. (Tab.: 16)

PCR: Es wurden insgesamt 549 diagnostische Proben mittels IS2404 PCR in der AITM getestet. In 41,8% (230/549) konnte *M. ulcerans* DNA nachgewiesen werden. (Wundabstrich: 41,5% [63/152]; FNA: 43,1% [72/167]; Stanzbiopsie: 45,3 [81/179]; operativ exzidiertes Gewebe: 27,5% [14/51]). (Tab.: 16)

Anzahl der positiv getesteten Proben/Gesamtanzahl der getesteten Proben [N (%)]/Testverfahren

Art der Läsion	Behandlungszentrum	Wundabstrich		FNA ^a		Stanzbiopsie		Chirurgisch exzidierte Biopsie	
		MIC [N(%)] ^b	PCR [N(%)] ^c	MIC [N(%)]	PCR [N(%)]	MIC [N(%)]	PCR [N(%)]	MIC [N(%)]	PCR [N(%)]
Nicht-ulzerativ	Tsévié %	ND ^d	ND	9/23 (39,1)	27/49 (55,1)	NV ^e	32/50 (64,0)	NV	2/3 (66,7)
	Sotouboua %	ND	ND	NV	0/1 (0)	NV	NV	NV	0/2 (0)
	Agbetiko %	ND	ND	NV	NV	NV	NV	NV	NV
	Gesamt %	ND	ND	9/23 (39,1)	27/50 (54,0)	NV	32/50 (64,0)	NV	2/5 (40,0)
Ulzerativ	Tsévié %	27/115 (23,5)	63/142 (44,4)	31/92 (33,7)	45/111 (40,5)	NV	49/121 (40,5)	NV	12/44 (27,3)
	Sotouboua %	0/1 (0,0)	0/9 (0,0)	NV	0/5 (0,0)	NV	0/6 (0,0)	NV	0/2 (0,0)
	Agbetiko %	NV	0/1 (0,0)	NV	0/1 (0,0)	NV	0/2 (0,0)	NV	NV
	Gesamt %	27/116 (23,3)	63/152 (41,5)	31/92 (33,7)	45/117 (38,5)	NV	49/129 (38,0)	NV	12/46 (26,1)
Alle		27/116 (23,3)	63/152 (41,5)	40/115 (34,8)	72/167 (43,1)	NV	81/179 (45,3)	NV	14/51 (27,5)

Tab. 16: Positivitätsraten der getesteten Proben

Die Tabelle 16 beschreibt die Positivitätsraten, d.h. die Gesamtzahl der positiv getesteten Proben geteilt durch die Anzahl aller getesteten Proben pro Testverfahren, Probenart und Läsion; die diagnostischen Proben von 202 BUD-Verdachtsfällen aus drei Behandlungszentren in Togo (CHR Maritime, Tsévié, CHP Sotouboua, USP Agbetiko) wurden in der Gesamtstudienzeit von 09.2007 bis 08.2010 gesammelt. Aufgrund multipler Probenabnahmen kann von der Probenanzahl nicht auf die Zahl der BUD-Verdachtsfälle, bzw. BUD-Fälle rückgeschlossen werden.

- FNA, Feinnadelaspirat
- MIC, mikroskopische Untersuchung zur Detektion säurefester Stäbchenbakterien
- PCR, IS2404, Gel basierte Polymerase-Ketten-Reaktion
- ND, nicht durchgeführt
- NV, nicht verfügbar

Quelle: Tabelle 16: Modifiziert nach: Bretzel, G.; Huber, KL.; Kobara, B.; Beissner, M.; Piten, E.; Herbing, KH., et.al.; *Laboratory Confirmation of Buruli Ulcer Disease in Togo, 2007-2010*. PLOS Neglected Tropical Diseases NTD, 2011.: p. 28.[50].

4.1.5 Labordiagnostische Untersuchungsergebnisse der BUD-Fälle

54% der 202 klinischen BUD-Verdachtsfälle wurden mittels Labordiagnostik als BUD-Fälle (n=109) bestätigt. 39,5% (43/109) wurden mit zwei (Mikroskopie und PCR) und 60,5% (66/109) mit nur einem labordiagnostischen Test (PCR) als BUD-Fälle bestätigt.

4.1.5.1 BUD-Fallbestätigung durch Mikroskopie

Von 71,3% (144/202) der BUD-Verdachtsfälle lagen OT (n=144) zur Analyse vor. Bei 29,9% (43/144) der BUD-Verdachtsfälle konnte durch Mikroskopie das Vorhandensein von AFB bestätigt werden. (Tab.: 17)

4.1.5.2 BUD-Fallbestätigung durch IS2404 PCR

Von 100% (202/202) der BUD-Verdachtsfälle wurden die diagnostischen Proben zur PCR-Analyse in die AIMT versandt (3.2.5.2.ff). Für jeden BUD-Verdachtsfall liegt ein PCR-Ergebnis vor. Die BUD-Fallbestätigungsrate für den gesamten Studienzeitraum betrug 54,0% (109/202); 34,9% (38/109) der BUD-Verdachtsfälle mit nicht-ulzerativen Läsionen und 65,1% (71/109) der BUD-Verdachtsfälle mit ulzerativen Läsionen wurden als BUD-Fälle bestätigt. (Tab.: 17)

4.1.5.2.1 PCR-Bestätigung der BUD-Fälle mit nicht-ulzerativen Läsionen

Von 51 BUD-Verdachtsfällen mit nicht-ulzerativen Läsionen wurden 74,5% (38/51) mittels IS2404 PCR positiv getesteter Gewebeproben (FNA: 55,3% [26/47], Stanzbiopsien: 68,2% [30/44], chirurgisch exzidiertes Gewebe: 66,7% [2/3]) als BUD-Fälle bestätigt. Von 33 BUD-Fällen dieser Gruppe (n=51) waren sowohl FNA- als auch Stanzbiopsie-Proben verfügbar. Dabei zeigte sich, dass die Bestätigungsrate für Stanzbiopsien (90,9% [30/33]) signifikant ($p=0,03$) höher als die Bestätigungsrate für FNA-Proben (69,7% [23/33]) war. In 60,6% (20/33) wiesen beide Probentypen ein positives PCR Ergebnis auf, 9,1% (3/33) wurden nur durch ein positives PCR-Ergebnis der FNA-Probe bestätigt und weitere 30,3% (10/33) konnten nur durch ein positives PCR-Ergebnis der Stanzbiopsie-Probe bestätigt werden. (Tab.: 17)

4.1.5.2.2 PCR-Bestätigung der BUD-Fälle mit ulzerativen Läsionen

Von 151 BUD-Verdachtsfällen mit ulzerativen Läsionen wurden 47,1% (71/151) mittels IS2404 PCR positiv getesteter diagnostischer Proben (Wundabstriche: 38,9% [51/131], FNA: 37,5% [39/104], Stanzbiopsien: 41,1% [39/95], chirurgisch exzidiertes Gewebe: 22,2% [4/18]) als BUD-Fälle bestätigt. Von 27,1% (41/151) der BUD-Fälle lagen Wundabstrich, FNA und Stanzbiopsie zum Vergleich der Bestätigungsraten vor (entsprechend Tab.: 8). Es ergab sich hierbei kein signifikanter Unterschied ($p=0,22$) der Probentypen (Wundabstrich: 75,6% [31/41], FNA: 87,8% [36/41], Stanzbiopsie: 87,8% [36/41]). (Tab.: 17)

BUD-Fallbestätigungsraten

Art der Läsion ^a	Behandlungszentrum	BUD-Verdachtsfälle	MIC ^b			PCR ^c		
			Bestätigte BUD-Fälle [N]	BUD-Verdachtsfälle [N]	Fall-Bestätigungsrate (%)	Bestätigte BUD-Fälle [N]	BUD-Verdachtsfälle [N]	Fall-Bestätigungsrate (%)
Nicht-ulzerativ	Tsévié	49	9	23	(39.1)	38	49	(77,6)
	Sotouboua	2	NV ^d	NV	NV	0	2	(0.0)
	Agbetiko	0	NV	NV	NV	NV	NV	NV
	Gesamt	51	9	23	(39.1)	38	51	(74.5)
Ulcerativ	Tsévié	138	34	120	(28.3)	71	138	(51.4)
	Sotouboua	12	0	1	(0.0)	0	12	(0.0)
	Agbetiko	1	NV	NV	NV	0	1	(0.0)
	Gesamt	151	34	121	(28.1)	71	151	(47.1)
Alle		202	43	144	(29.9)	109	202	(54.0)

Tab. 17: BUD-Fallbestätigungsraten

Tabelle 17 beschreibt die Gesamt-BUD-Fallbestätigungsraten, d.h. die Anzahl der laborbestätigten (PCR) BUD-Fälle geteilt durch die Gesamtzahl der BUD-Verdachtsfälle (Daten pro Probenart werden nicht dargestellt); für die mikroskopische Diagnostik lagen nur von 144 Patienten mikroskopische Präparate vor; die diagnostischen Proben der 202 BUD-Verdachtsfälle stammen aus drei Studienzentren in Togo (CHR Maritime, Tsévié, CHP Sotouboua, USP Agbetiko; Studienzeitraum: September 2007 bis August 2010). Angaben zur Anzahl der getesteten Proben weist diese Tabelle nicht auf, diese werden in 3.2.5.5 und in Tab.: 9, die Positivitätsraten der Analysen werden in Tab.: 16 angegeben.

- Nicht-ulzerative Läsionen: FNA-, Stanzbiopsie- und chirurgisch exzidierte Gewebeproben wurden analysiert; ulzerative Läsionen: Abstrich-, FNA-, Stanzbiopsie, sowie chirurgisch exzidierte Gewebeproben wurden analysiert.
- Test: MIC, mikroskopische Untersuchung zur Detektion säurefester Stäbchen; Wundabstrich- und FNA-Proben wurden analysiert.
- Test: PCR, Wundabstrich-, FNA-, Stanzbiopsie- sowie chirurgisch exzidierte Gewebeproben wurden analysiert;
- NV, nicht verfügbar

Quelle: modifiziert nach Bretzel, G.; Huber, KL.; Kobara, B.; Beissner, M.; Piten, E.; Herbing, KH. et al.; *Laboratory Confirmation of Buruli Ulcer Disease in Togo, 2007-2010*. PLOS Neglected Tropical Diseases NTD, 2011.: p. 28 [50].

4.1.5.2.3 Rücklauf der standardisierten Probeabnahme-Sets pro BUD-Fall

Von 86,8% (33/38) der bestätigten BUD-Fällen mit nicht ulzerativen Läsionen (n=38) lagen vollständige und dementsprechend von 13,2% (5/38) unvollständige Probeabnahmesets gemäß den Vereinbarungen (3.2.5.2) aus dem CHR vor. Von den bestätigten BUD-Fällen mit ulzerativen Läsionen (n=71) lagen von 57,7% (41/71) und von 42,3% (30/71) unvollständige Probeabnahmesets aus dem CHR vor. Aus den Behandlungszentren CHP (n=3) und USP (n=1) lagen insgesamt vier vollständige Probenabnahmesets vor, allerdings konnte kein BUD-Fall aus diesen Zentren bestätigt werden. (Tab.: 18)

Anzahl der Probeabnahme-Sets nach Läsion und Behandlungszentrum pro BUD-Fall

Behandlungszentrum	Art der Läsion der bestätigten BUD-Fälle	Unvollständige „specimen sets“ der BUD-Fälle pro Behandlungszentrum und Läsion	Vollständige „specimen sets“ der BUD-Fälle pro Behandlungszentrum und Läsion
CHR, Maritime Tsévié CHP, Sotouboua USP, Agbetiko	Nicht-ulzerativ (n=38)	5 (5/38 [13,2%]) 0 (0/0 [0%]) 0 (0/0 [0%]) (33 (33/38 [86,8%]) 0 (0/0 [0%]) 0 (0/0 [0%])
CHR, Maritime Tsévié CHP, Sotouboua USP, Agbetiko	Ulzerativ (n=71)	30 (30/71 [42,3%]) 0 (0/0 [0%]) 0 (0/0 [0%])	41 (41/71 [57,7%]) 0 (3/0 [0%]) 0 (1/0 [0%])
Total	109	35 (35/109 [32,1%])	74 (74/109 [67,8%])

Tab. 18: Anzahl der standardisierten Probeabnahmesets pro BUD-Fall

4.1.6 Entwicklung der PCR-Fallbestätigung

4.1.6.1 Entwicklung der PCR-Fallbestätigungsrate pro Beobachtungsperiode und Kalenderjahr

4.1.6.1.1 Entwicklung der PCR-Fallbestätigung pro Beobachtungsperiode

Die Fallbestätigungsrate lag bei 42,9% (36/84) in der ersten Beobachtungsperiode, bei 56,1% (37/66) in der zweiten Beobachtungsperiode und bei 69,2% (36/52) in der dritten Beobachtungsperiode. Die Fallbestätigungsrate nahm über den gesamten Beobachtungszeitraum mit einem definitiven Trend zu (Determinationskoeffizient $R^2 = 1$). (Abb.: 4)

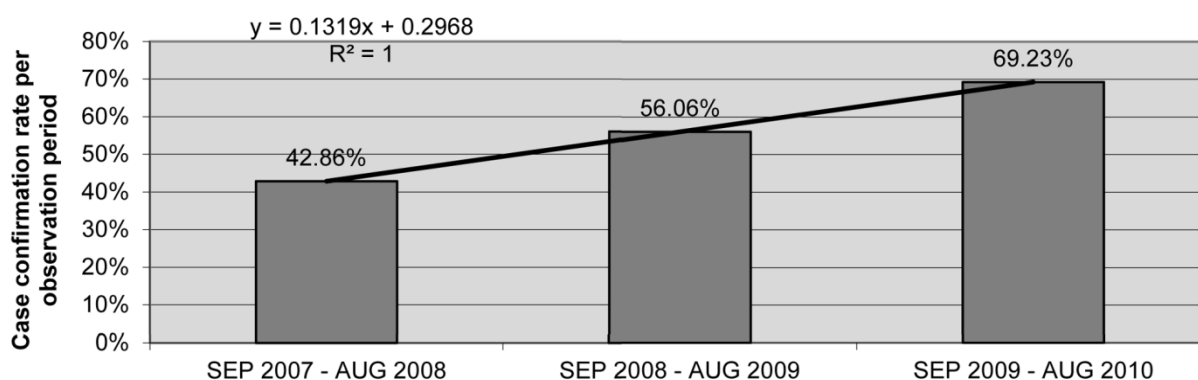


Abb. 4: Entwicklung der BUD-Fallbestätigung pro Beobachtungsperiode

Quelle: Bretzel, G.; Huber, KL.; Kobara, B.; Beissner, M.; Piten, E.; Herbing, KH. et al., *Laboratory Confirmation of Buruli Ulcer Disease in Togo, 2007-2010*. PLOS Neglected Tropical Diseases NTD, 2011.: p28.[50]

4.1.6.1.2 Entwicklung der PCR-Fallbestätigung pro Kalenderjahr

In Bezug auf die Beobachtungszeiträume pro Kalenderjahr ergaben sich Fallbestätigungsrate von 41,7% (10/24) für 2007, von 45,8% (38/83) für 2008, von 58,9% (33/56) für 2009 und von 71,8% (28/39) für 2010.

4.1.6.2 Entwicklung der PCR-Fallbestätigungsrate pro Läsionsart

4.1.6.2.1 Entwicklung der PCR-Fallbestätigungsrate pro Läsionsart und Beobachtungsperiode

Die PCR-Fallbestätigungsrate der BUD-Verdachtsfälle mit nicht-ulzerativen Läsionen lagen bei 66,6% (8/12) in der ersten Beobachtungsperiode (September 2007 – August 2008), bei 61,5% (8/13) in der zweiten Beobachtungsperiode (September 2008 – August 2009) und bei 84,6% (22/26) in der letzten Beobachtungsperiode (September 2009 – August 2010) des Gesamtbeobachtungszeitraums.

Die PCR-Fallbestätigungsrate der BUD-Verdachtsfälle mit ulzerativen Läsionen lagen bei 38,8% (28/72) in der ersten Beobachtungsperiode (September 2007 – August 2008), bei 54,7% (29/53) in der zweiten Beobachtungsperiode (September 2008 – August 2009) und bei 53,8% (14/26) in der letzten Beobachtungsperiode (September 2009 – August 2010) des Gesamtbeobachtungszeitraums. (Tab.: 19)

Beobachtungsperiode	Läsion (Läsionsart der bestätigten BUD-Fälle/Verdachtsfälle nach Beobachtungsperiode)		BUD-Fälle (PCR-bestätigte Fälle / Verdachtsfällen nach Beobachtungsperiode)
	Nicht-ulzerativ	Ulzerativ	
I. September 2007 - August 2008	8 (8/12 [66,6%])	28 (28/72 [38,8%])	36 (36/84 [42,9%])
II. September 2008 - August 2009	8 (8/13 [61,5%])	29 (29/53 [54,7%])	37 (37/66 [56,1%])
III. September 2009 - August 2010	22 (22/26 [84,6%])	14 (14/26 [53,8%])	36 (36/52 [69,2%])
Gesamt	38 (38/51 [74,5%])	71 (71/151 [47,1%])	109 (109/202 [54,0%])

Tab. 19: BUD-Fälle pro Läsionsart und Beobachtungsperiode

4.1.6.2.2 Entwicklung der PCR-Fallbestätigungsrate pro Läsionsart und Kalenderjahr

Die PCR-Fallbestätigungsrate der BUD-Verdachtsfälle mit nicht-ulzerativen Läsionen stieg von 75,0% (3/4) im Kalenderjahr 2007 auf 89,5% (17/19) im Kalenderjahr 2010 an. Die PCR-Fallbestätigungsrate der BUD-Verdachtsfälle mit ulzerativen Läsionen stieg von 35,0% (7/20) im Kalenderjahr 2007 auf 55,0% (11/20) im Kalenderjahr 2010 an. (Tab.: 20)

Kalenderjahr	Läsion		BUD-Fälle (bestätigte Fälle/Verdachtsfälle pro Kalenderjahr)
	Nicht-ulzerativ	Ulzerativ	
2007	3 (3/4 [75,0%])	7 (7/20 [35,0%])	10 (10/24 [41,6%])
2008	6 (6/12 [50,0%])	32 (32/71 [45,1%])	38 (38/83 [45,8%])
2009	12 (12/16 [75,0%])	21 (21/40 [52,5%])	33 (33/56 [58,9%])
2010	17 (17/19 [89,5%])	11 (11/20 [55,0%])	28 (28/39 [71,8%])
Gesamt	38 (38/51 [74,5%])	71 (71/151 [47,1%])	109 (109/202 [54,0%])

Tab. 20: BUD-Fälle pro Läsionsart und Kalenderjahr

4.1.6.3 Erkrankungsdauer der BUD-Fälle

Die durchschnittliche Erkrankungsdauer der BUD-Fälle mit nicht-ulzerativen Läsionen lag bei 173,2 d in der ersten Beobachtungsperiode (September 2007 – August 2008), bei 15,0 d in der zweiten Beobachtungsperiode (September 2008 – August 2009) und bei 23,1 d in der letzten Beobachtungsperiode (September 2009 – August 2010) des Gesamtbeobachtungszeitraums. (Tab.: 21)

Die durchschnittliche Erkrankungsdauer der BUD-Fälle mit ulzerativen Läsionen lag bei 308,3 d in der ersten Beobachtungsperiode (September 2007 – August 2008), bei 130,1 d in der zweiten Beobachtungsperiode (September 2008 – August 2009) und bei 74,4 d in der letzten Beobachtungsperiode (September 2009 – August 2010) des Gesamtbeobachtungszeitraums. (Tab.: 21)

Die durchschnittliche Erkrankungsdauer bis zur ersten Vorstellung in den Behandlungszentren lag bei den BUD-Fällen mit nicht-ulzerativen Läsionen bei 53 d und bei BUD-Fällen mit ulzerativen Läsionen bei 189,4 d innerhalb der Gesamt-Beobachtungsdauer von September 2007 bis August 2010. (Tab.: 21)

Erkrankungsdauer der BUD-Fälle pro Läsionsart und Beobachtungsperiode

Beobachtungsperiode	Erkrankungsdauer bis zur ersten Vorstellung in Tagen	
	Nicht-ulzerative Läsion	Ulzerative Läsion
I. September 2007 – August 2008	Range: 42 - 720 d; (Σ : 1386, n=8); Ø: 173,2 d	Range: 7 - 1560 d; (Σ : 8634, n=28); Ø: 308,3 d
II. September 2008 – August 2009	Range: 7 - 21 d; (Σ : 120, n=8); Ø: 15,0 d	Range: 10 - 450 d; (Σ : 3771, n=29) Ø: 130,1 d
III. September 2009 – August 2010	Range: 4 - 56 d; (Σ : 508, n=22); Ø: 23,1 d	Range: 21 - 168; (Σ : 1042, n=14); Ø: 74,4 d
September 2007 – August 2010	Range: 4 - 720 d; (Σ : 2014, n=38); Ø: 53,0 d	Range: 7 - 1560 d; (Σ : 13447, n=71); Ø: 189,4 d

Tab. 21: Erkrankungsdauer der BUD-Fälle pro Läsionsart und Beobachtungsperiode

4.1.6.3.1 Erkrankungsdauer der BUD-Fälle pro Läsionsart und Kalenderjahr

Die durchschnittliche Erkrankungsdauer bis zur ersten Vorstellung in den Behandlungszentren der BUD-Fälle mit nicht-ulzerativen Läsionen lag bei 318,7 d im Kalenderjahr 2007, bei 74,0 d im Kalenderjahr 2008, bei 25,7 d im Kalenderjahr 2009 und bei 17,9 d im Kalenderjahr 2010 (Gesamtdurchschnitt: 53,0 d). (Tab.: 22)

Die durchschnittliche Erkrankungsdauer bis zur ersten Vorstellung in den Behandlungszentren der BUD-Fälle mit ulzerativen Läsionen lag bei 386,0 d im Kalenderjahr 2007, bei 239,2 d im Kalenderjahr 2008, bei 107,6 d im Kalenderjahr 2009 und bei 75,6 d im Kalenderjahr 2010 (Gesamtdurchschnitt: 189,4 d). (Tab.: 22)

Beobachtung im Kalenderjahr	Erkrankungsdauer bis zur ersten Vorstellung im Mittel	
	Nicht-ulzerative Läsion	Ulzerative Läsion
2007	Range: 56 - 720 d (Σ: 956, n=3); Ø: 318,7 d	Range: 56 - 1170 d (Σ: 2702, n=7); Ø: 386,0 d
2008	Range: 14 - 210 d (Σ: 444, n=6); Ø: 74,0 d	Range: 7 - 1560 d (Σ: 7654, n=32); Ø: 239,2 d
2009	Range: 7 - 84 d (Σ: 309, n=12); Ø: 25,7 d	Range: 10 - 420 d (Σ: 2259, n=21); Ø: 107,6 d
2010	Range: 4 - 42 d (Σ: 305, n=17); Ø: 17,9 d	Range: 21 - 168 d (Σ: 832, n=11); Ø: 75,6 d
2007 - 2010	Range : 7 – 720 d (Σ: 2014, n=38); Ø: 53,0 d	Range: 7 – 1560 d (Σ: 13447, n=71); Ø: 189,4 d

Tab. 22: Erkrankungsdauer der BUD-Fälle pro Läsionsart und Kalenderjahr

4.1.6.4 *M. ulcerans*-Nachweis bei BUD-Verdachtsfällen mit Sekundärläsion

4.1.6.4.1 BUD-Verdachtsfälle mit zweiter Läsion

Von vier BUD-Verdachtsfällen mit zwei Läsionen aus dem Behandlungszentrum CHR Maritime, Tsévié, konnten bei der Erstvorstellung zwei Probenabnahmesets (engl.: „specimen-set“), somit ein specimen-set pro Läsion gewonnen werden. Bei einem dieser Verdachtsfälle konnte weder die erste noch die zweite Läsion als BUD bestätigt werden. Bei den drei Weiteren konnte die erste Läsion als BUD bestätigt werden, während in den Zweitläsionen nur bei zwei der drei BUD-Patienten *M. ulcerans*-DNA mittels IS2404 PCR nachgewiesen werden konnte.

4.1.6.4.2 Entwicklung der BUD-Fallbestätigung bei Folgeuntersuchung

Bei 13 klinischen BUD-Verdachtsfällen mit ulzerativen Läsionen aus der Gruppe der 202 BUD-Verdachtsfälle wurden Sekundärproben („follow-up specimen-sets“) zur erneuten Diagnostik mittels IS2404 PCR abgenommen. Dabei konnte bei einem klinischen BUD-Verdachtsfall weder bei der ersten noch bei der zweiten PCR-Testung das Vorhandensein von *M. ulcerans* DNA bestätigt werden. 12

BUD-Verdachtsfälle wurden bereits durch die PCR-Testung der initialen Proben als BUD-Fälle bestätigt, in acht der 12 Sekundärproben konnte erneut *M. ulcerans* DNA nachgewiesen werden.

4.1.6.5 Lokalisation und WHO-Kategorie der PCR-bestätigten BUD-Läsionen

Bei 90,8% (99/109) der PCR-bestätigten BUD-Patienten waren die Läsionen an Extremitäten oder Schultern lokalisiert, ohne dass eine Körperseite signifikant häufiger betroffen gewesen wäre (rechte Körperhälfte: 46,8% [51/109]; linke Körperhälfte: 44,1% [48/109]).

Alle PCR-bestätigten BUD-Läsionen wurden entsprechend der WHO-Kategorie (siehe 1.6) eingeteilt. 39,4% (43/109) der Läsionen waren in Kategorie 1, 37,6% (41/109) in Kategorie 2 und 22,9% (25/109) in Kategorie 3 einzuordnen. (Tab.: 23)

Läsionsart	Kategorie 1: (einzelne Läsion < 5cm)	Kategorie 2: (einzelne Läsion 5 – 15 cm)	Kategorie 3: (Läsion >15 cm, multiple Läsionen, Osteomyelitis)	BUD-Fälle
Nicht-ulzerativ	19 (19/43[44,2%])	10 (10/41 [24,4%])	9 (9/25 [36,0%])	38 (38/109 [34,8%])
Ulzerativ	24 (24/43 [55,8%])	31 (31/41 [75,6%])	16 (16/25 [64,0%])	71 (71/109 [65,1%])
Gesamt	43 (43/109 [39,4%])	41 (41/109 [37,6%])	25 (25/109 [22,9%])	109 (109/109 [100%])

Tab. 23: Einteilung der bestätigten BUD-Läsionen nach WHO Kategorien

4.1.7 Ergebnisse der externen Qualitätskontrolle der Mikroskopie

4.1.7.1 Positivitätsraten der mikroskopischen EQA

36,8% (85/231) der OT die im CHR angefertigt und mikroskopisch gelesen worden waren, wurden zur EQA an die AITM geschickt. In der AITM ergab sich eine Positivitätsrate von 43,5% (37/85); (AFB-positive Wundabstriche: 21,2% [18/85]; AFB-positive FNA: 22,3 [19/85]). (Abb.: 20)

4.1.7.2 Konkordanzraten der mikroskopischen EQA bezogen auf Objektträger

80% (68/85) der Ergebnisse der mikroskopischen Analyse pro OT des CHR und der AITM waren konkordant. 84,3% (43/51) der Mikroskopie Ergebnisse von Wundabstrichpräparaten und 73,5% (25/34) der Mikroskopie Ergebnisse von FNA-Präparaten aus dem CHR waren mit den mikroskopischen EQA Ergebnissen der AITM konkordant.

4.1.7.3 Konkordanzraten der mikroskopischen EQA bezogen auf Patienten

Von 18,3% (37/202) der BUD-Verdachtsfälle lagen OT zur EQA vor (Wundabstriche von 18 Patienten, FNA von 19 Patienten). In 62,2% (23/37) waren die AITM Ergebnisse mit den Ergebnissen des CHR konkordant; von 14 Patienten war das Mikroskopie-Ergebnis des CHR als falsch negativ zu bewerten.

4.1.8 Epidemiologische Basisdaten der bestätigten BUD-Fälle

4.1.8.1 Alter und Geschlecht der BUD-Fälle

Von 109 bestätigten BUD-Fällen waren 47,7% (52/109) weiblichen und 52,3% (57/109) männlichen Geschlechts. 59,6% (65/109) der bestätigten BUD-Fälle befanden sich in der Altersgruppe der 5 bis 14 Jährigen. Die Altersgruppen lagen zwischen 2 und 60 Jahren; das Durchschnittsalter war 17,3 Jahre, der Median lag bei 12 Jahren. (Abb.: 5)

Altersgruppen der BUD-Patienten

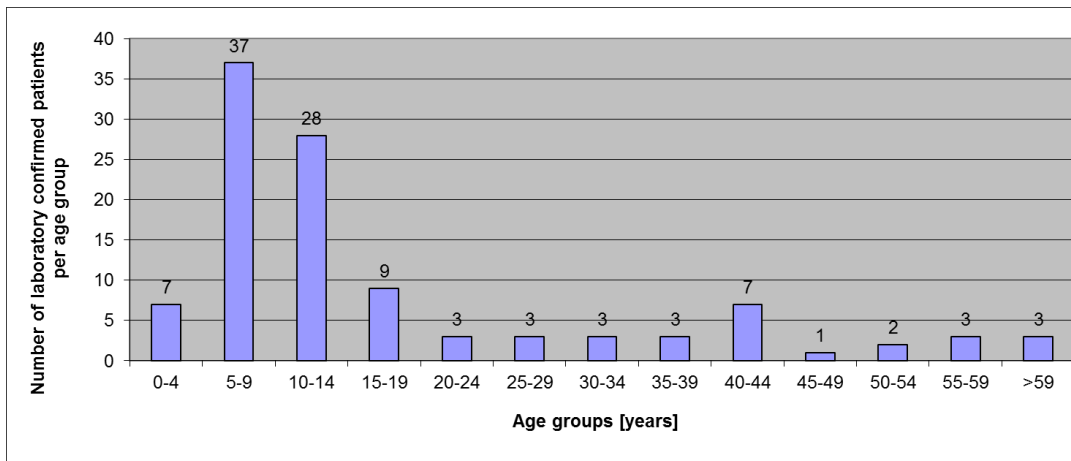


Abb. 5: Altersverteilung der BUD-Fälle

4.1.8.2 Kartographische Erfassung der Wohnorte der BUD-Fälle, Region Maritime

4.1.8.2.1 Orientierende Übersichtskarte, Togo

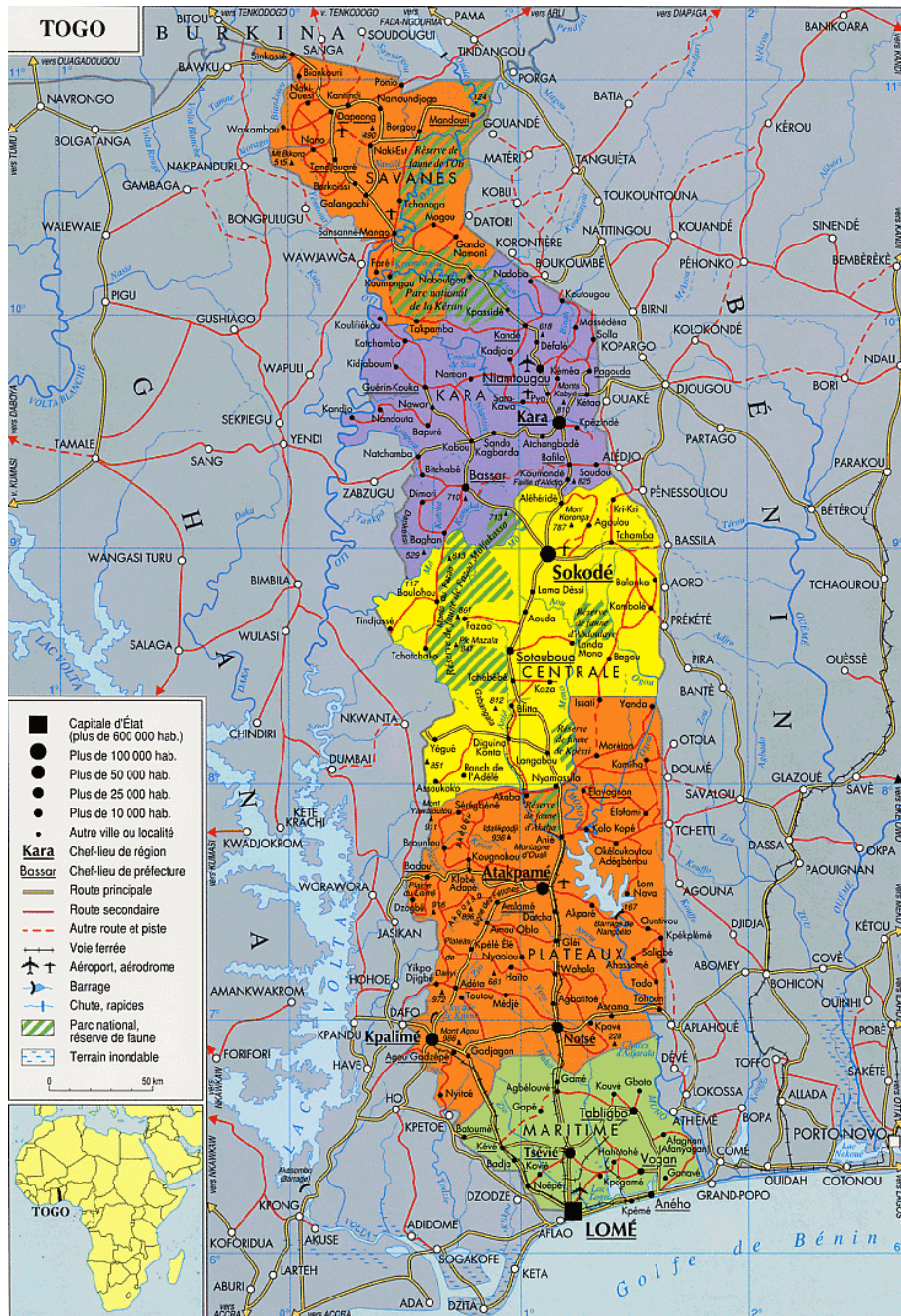


Abb. 6: Orientierende Übersichtskarte Togo

Quelle: http://www.lib.utexas.edu/maps/map_sites/country_sites.html#

4.1.8.2.2 BUD-Falldistribution anhand der Karte von Region Maritime, Togo

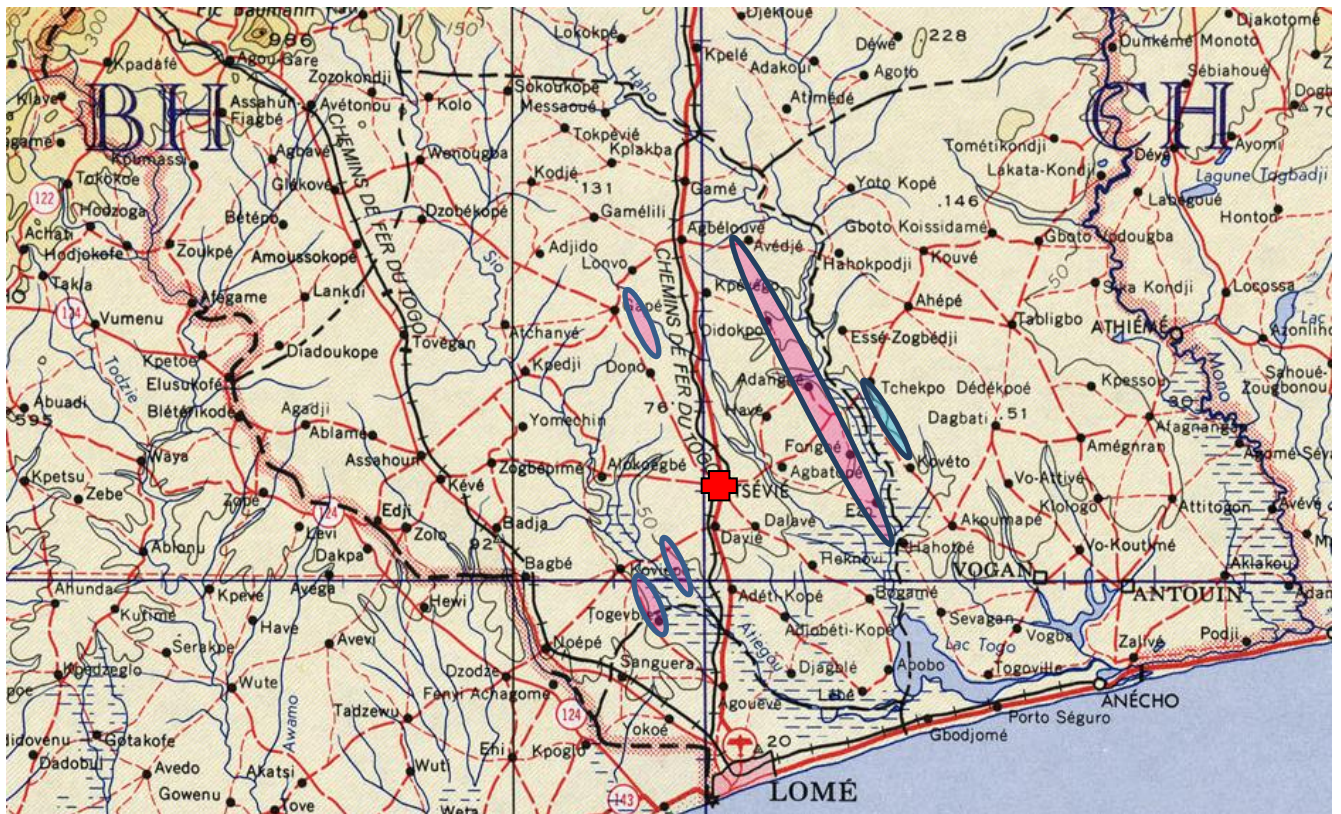


Abb. 7: BUD-Fallverteilung Region Maritime

Quelle: <http://www.lib.utexas.edu/maps/imw/txu-oclc-6654394-nb-31-3rd-ed.jpg>

Legende Abb.14:

■ : CHR Maritime, Tsévié

○ : BUD-Fälle im Bezirk Yoto

○ : BUD-Fälle im Bezirk Zio

4.1.8.3 Herkunft der BUD-Patienten

Die PCR-bestätigten BUD-Fälle kamen aus den fünf Regierungsbezirken der Region Maritime. 44,9% (49/109) der Patienten kamen aus dem Bezirk Yoto, 48,6% (53/109) aus dem Bezirk Zio, 4,5% (5/109) aus dem Bezirk Vo und je 0,9% (1/109) aus den Bezirken Lacs und Golfe (3.2.8.1).

4.1.8.4 BUD-Fallverteilung innerhalb der Bezirke Yoto und Zio, Region Maritime

102 BUD-Fälle (Yoto, n=49, Zio, n=53) der 156 klinischen BUD-Verdachtsfällen der Bezirke Yoto (n=69) und Zio (n=87) wurden labordiagnostisch bestätigt (Fallbestätigungsrate: 65,4% [102/156]); 93,6% (102/109) der bestätigten BUD-Fälle der Region Maritime entstammten diesen zwei Bezirken.

4.1.8.5 BUD-Fälle im Bezirk Yoto, Region Maritime

Aus dem Bezirk Yoto konnten 71,1% (49/69) der BUD-Verdachtsfälle als BUD-Fälle bestätigt werden. Alle Patienten aus Yoto entstammten drei direkt benachbarten Dörfern auf einer Gesamtfläche von circa 12km² (6km x 2km), was einem fokalen Verteilungsmuster der BUD-Distribution entspricht. Die Heimatdörfer der BUD-Fälle aus Yoto liegen in einer sehr ursprünglichen, ländlichen Region, inmitten einer Sumpflandschaft östlich des Flusses Haho. Desweiteren zeigte sich, dass 79,6% der 49 BUD-Fälle Kinder und Jugendliche unter dem 17. Lebensjahr (39/49, [79,6%]), darunter auch drei Geschwisterpaare im Kindesalter waren. Die Fallbestätigungsraten innerhalb des Bezirkes Yoto pro Beobachtungsperioden und Läsionsart werden in Tabelle 24 gezeigt.

Beobachtungsperiode Bezirk Yoto	Läsion (Läsionsart der bestätigten BUD-Fälle pro Verdachtsfälle pro Beobachtungsperiode)		BUD-Fälle in Yoto (bestätigte BUD-Fälle/ Verdachtsfälle/Beobachtungsperiode)
	Nicht ulzerativ	ulzerativ	
I. Sept. 2007-Aug. 2008	2 (2/2 [100,0%])	12 (12/19 [63,1%])	14 (14/21 [66,6%])
II. Sept. 2008-Aug. 2009	5 (5/6 [83,3%])	9 (9/17 [52,9%])	14 (14/23 [60,8%])
III. Sept. 2009-Aug. 2010	15 (15/17 [88,2%])	6 (6/8 [75,0%])	21 (21/25 [84,0%])
Gesamt	22 (22/25 [88,0%])	27 (27/44 [61,4%])	49 (49/69 [71,1%])

Tab. 24: BUD-Fälle pro Beobachtungsperiode, Bezirk Yoto

4.1.8.6 BUD-Fälle im Bezirk Zio, Region Maritime

Innerhalb Zio, dem größten Bezirk der Region Maritime, konnte bei 60,9% (53/87) der 87 BUD-Verdachtsfälle labordiagnostisch BUD nachgewiesen werden; die Patienten lebten teilweise in großer Distanz zueinander in Dörfern westlich des Flusses Haho, an den Flüssen Aye, Ativi, Lily und Zio sowie innerhalb der die Flüsse umgebenden Sumpfgebiete. Im Bezirk Zio entsprach die BUD-Falldistribution einem disseminierten Verteilungsmuster. 69,8% (37/53) der bestätigten Fälle waren Kinder und Jugendliche unter 17 Jahre, darunter waren auch zwei Geschwisterpaare. (Tab.: 25)

Beobachtungszeitraum Bezirk Zio	Läsion (Läsionsart der bestätigten BUD Fälle/Verdachtsfälle pro Beobachtungsjahr)		BUD Fälle in Zio (bestätigte BUD-Fälle/ Verdachtsfälle/Beobachtungsjahr)
	Nicht ulzerativ	ulzerativ	
I. Sept. 2007-Aug. 2008	7 (7/11 [63,6%])	14 (14/33 [42,4%])	21 (21/44 [47,7%])
II. Sept. 2008-Aug. 2009	2 (2/4 [50,0%])	16 (16/21 [76,1%])	18 (18/25 [72,0%])
III. Sept. 2009-Aug. 2010	7 (7/9 [77,7%])	7 (7/9 [77,7%])	14 (14/18 [77,7%])
Gesamt	16 (16/24 [66,6%])	37 (36/63 [58,7%])	53 (53/87 [60,9%])

Tab. 25: BUD-Fälle pro Beobachtungsperiode, Bezirk Zio

5 Diskussion

5.1 Stellenwert der Mikroskopie und PCR für die Diagnostik der BUD

5.1.1 Mikroskopie

Die Mikroskopie dient in Endemiegebieten als schneller und kostengünstiger „firstline“ Test zur Bestätigung klinischer BUD-Verdachtsfälle in peripheren Laboratorien.

Bereits 2001 beschrieben N’Guessan et al. den Stellenwert der Mikroskopie in Endemiegebieten. Unter Abwägung der relativ niedrigen Sensitivität und deutlichen Untersucherabhängigkeit, jedoch hohen Spezifität der Methode, wurde die AFB-Mikroskopie als einfach und kostengünstig durchzuführendes Verfahren für die primäre Labordiagnostik unter Feldbedingungen eingestuft [92]. Innerhalb der letzten Dekade ergab sich eine zunehmende Anwendung der AFB-Mikroskopie in Laboren unterschiedlicher Ebenen (z.B. periphere „point of care“-Einheiten, regionale Hospitäler sowie Krankenhäuser der Maximalversorgung/Universitätskliniken). Im Zuge dessen beschäftigten sich wissenschaftliche Gruppen mit der Analyse von Primärdaten zur AFB-Mikroskopie aus verschiedenen Endemiegebieten Westafrikas [1, 63].

Für die Durchführung der AFB-Mikroskopie stehen derzeit im Wesentlichen drei Methoden zur Verfügung: die Fluoreszenz-Mikroskopie Auramin gefärbter Präparate, die klassische Färbung nach Ziehl-Neelsen (ZN) sowie die Kinyoun-Färbung. Bezüglich Sensitivität und Spezifität konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Auramin- und ZN-Färbung nachgewiesen werden [37, 66]. Im Hinblick auf apparative Ausstattung und Konservierbarkeit der Präparate eignet sich die ZN-Färbung jedoch besser für periphere Labore und erlaubt darüber hinaus kontinuierliche Qualitätssicherung [37, 64, 66].

Während die Sensitivität der Mikroskopie meta-analytisch bei 40-60% liegt, wurden in einzelnen Studien insbesondere bei BUD Patienten vor antibiotischer Therapie Positivitätsraten bzw. Sensitivitäten bis zu 80% beschrieben [4, 46, 47, 63, 64, 66, 67, 70, 93, 94].

Eine Studie der eigenen Arbeitsgruppe aus einem Endemiegebiet Ghanas zeigte, dass 30% der BUD Patienten mit ulzerativen Läsionen und 40% der Patienten mit nicht-ulzerativen Läsionen allein mittels Mikroskopie von Wundabstrichen bzw. Gewebeproben bestätigt werden konnten [46]. Die mikroskopische Diagnostik kann aufgrund ihres hohen positiven prädiktiven Wertes bereits 40 – 60% aller klinischen BUD-Verdachtsfälle bestätigen. Somit führt eine Stufendiagnostik (Mikroskopie gefolgt von molekularen Methoden bei mikroskopisch negativen Fällen) zu einer erheblichen Kostenreduktion [46, 67].

5.1.2 Mikroskopische Diagnostik und externe Qualitätssicherung der BUD in Togo

Innerhalb des bestehenden logistischen Netzwerkes der DAHWT war die ZN-Färbung bereits in den Laboren der Behandlungszentren zur Tuberkulosedagnostik etabliert und wurde gemäß Empfehlungen der WHO auch als Färbemethode der Wahl für die Diagnostik der BUD in Togo gewählt [37, 64].

In der vorliegenden Studie wurden mikroskopische Präparate von 144 BUD-Verdachtsfällen untersucht. Die Fallbestätigungsrate von ca. 30% war verglichen mit Daten anderer Studien sehr niedrig [46-48, 50, 66, 67, 94]. In Ermangelung eines lokalen Kompetenzpartners in Togo wurde zunächst die externe Qualitätssicherung der Mikroskopie (engl.: „external quality assurance“, EQA) an der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der medizinischen Klinik und Poliklinik IV des Klinikums der LMU München (AITM) etabliert. Während zu Studienbeginn der notwendige Austausch von defekten durch funktionstüchtige Mikroskope als vermeintlich ursächlich für die hohe Rate an falsch negativen Ergebnissen gesehen wurde, zeigte die EQA im weiteren Studienverlauf einen erheblichen Schulungsbedarf im Bereich der Probenabnahme und Prozesssierung sowie der Durchführung der mikroskopischen Analyse. Insgesamt standen von ca. 30% der Probanden keine Mikroskopie-Ergebnisse zur Verfügung, da Objektträger (OT) entweder nicht angefertigt, die Ergebnisse nicht ordnungsgemäß dokumentiert oder OT nach der ersten Analyse vor Ort verworfen wurden.

5.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die im Jahre 1999 von Stinear et al. für den DNA-Nachweis von *M. ulcerans* aus Patientenmaterial beschriebene IS2404 PCR gilt als diagnostischer Goldstandard der molekularbiologischen Bestätigung der BUD [1, 50, 70, 72]. Die PCR ist 100% spezifisch für *M. ulcerans*, da die Insertions-Sequenz (IS) 2404 unter humanpathogenen Mykobakterien ausschließlich im *M. ulcerans* Genom vorkommt. Die analytische Sensitivität dieser Methode liegt bei 1,5 *M. ulcerans* Genomäquivalenten, die diagnostische Sensitivität wird mit 95%-100% angegeben [1, 4, 47, 63, 89, 95]. Die Nachteile der PCR bestehen in der Notwendigkeit technisch hochwertig ausgestatteter Laboratorien und den damit verbundenen hohen Anschaffungs- und Erhaltungskosten, sowie hochqualifizierten Laborpersonals und eines effizienten Qualitätssicherungssystems.

Eine den tropischen Bedingungen angepasste auf Trockenreagenzien basierende IS2404-DRB-PCR (engl.: dry-reagent-based, DRB) wurde von Siegmund et al. entwickelt, in Ghana etabliert und validiert. Sensitivität und Spezifität entsprechen der konventionellen Methode [48, 89]. Die IS2404-DRB-PCR zeigt aufgrund lyophilisierter Reagenzien eine geringe Empfindlichkeit gegenüber Temperaturschwankungen (z.B. Unterbrechung der Kühlkette aufgrund von Stromausfall) und ist somit sehr gut für die Anwendung in BUD-Endemiegebieten unter tropischen Bedingungen geeignet.

Mit einer Nachweisgrenze von 0,01 *M. ulcerans* Genomäquivalenten ist die „IS2404 quantitative real-time PCR (qPCR)“ die derzeit sensitivste Methode, die Anwendung bleibt jedoch aus Kosten- und Kapazitätsgründen auf nationale und internationale Referenzlaboratorien beschränkt [95-97]. Aktuelle Daten der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass mittels IS2404 qPCR 5 - 10% aller mittels konventioneller PCR negativ getesteter Proben zusätzlich positiv bestätigt werden konnten [98, 99].

Die vor kurzem entwickelte LAMP-Technologie (Loop-mediated Isothermal amplification [LAMP]) repräsentiert innerhalb der molekularen BUD-Diagnostik eine weitere Amplifikationsmethode [97, 98, 100, 101]. Die analytische Sensitivität ist mit einer Nachweisgrenze von 0.01-0.1 *M. ulcerans* Genomäquivalenten zwischen der konventionellen IS2404 PCR und der IS2404 qPCR einzuordnen [97]. Da nur einfachste Gerätschaften benötigt werden und die Methode leicht zu erlernen ist, eignet sich die LAMP-Technologie bestens zur Anwendung unter Feldbedingungen [97, 100, 101].

5.1.4 PCR-Diagnostik der Buruli Ulkus Erkrankung in Togo

Gemäß zum Zeitpunkt der Studie geltenden WHO-Empfehlungen sollten mindestens 50% der BUD-Fälle weltweit durch PCR-Diagnostik bestätigt werden [1, 2, 50, 63]. Mit Initiierung der Kollaboration zwischen DAHWT, BUD-Referenzzentrum CHR Maritime, Tsévié, PNLUB und AITM wurde 2007 erstmals die Voraussetzung zur systematischen PCR-Diagnostik sämtlicher BUD-Verdachtsfälle in Togo geschaffen.

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten insgesamt 54% der BUD-Verdachtsfälle mittels konventioneller IS2404 PCR als BUD Fälle bestätigt werden. Durch gezielte Schulungen der togoischen Mitarbeiter in klinischer Diagnose und standardisierter Probenabnahme wurde die initial niedrige BUD-Fallbestätigungsrate von 43% im ersten Studienjahr kontinuierlich auf über 69% im dritten Studienjahr gesteigert. Obwohl nicht von allen Patienten vollständige Probensets vorlagen, war die Qualität des Untersuchungsmaterials so hoch, dass für jeden Patienten die labortechnische Diagnosestellung möglich war. Im dritten Studienjahr konnte darüber hinaus die Zahl der abgenommenen bzw. untersuchten Proben pro Patient gemäß WHO-Empfehlungen reduziert werden [63].

Innerhalb der Region Central konnten aus logistischen Gründen nur zwei Schulungen abgehalten, somit der Standard der Region Maritime nicht erreicht werden.

Die Probenabnahme wurde Anfang des Jahres 2008 durch die diagnostische Feinnadelaspiration (FNA) erweitert. Diese Abnahmetechnik wurde für die Diagnostik nicht-ulzerativer Läsionen etabliert und validiert um im Vergleich zur Stanzbiopsie eine weniger invasive Zellmaterialgewinnung zu ermöglichen [50, 64, 87, 102, 103]. Im Gegensatz zu Studienergebnissen aus Ghana und Benin, die vergleichbare PCR Sensitivitäten von FNA und Stanzbiopsien ergaben [87, 102-104], wurden in der vorliegenden Studie nicht-ulzerative Läsionen signifikant häufiger durch 3 mm Stanzbiopsien als durch FNAs mittels PCR bestätigt. Obwohl aktuelle WHO-Empfehlungen darauf abzielen die Anwendung von Stanzbiopsien zu minimieren [63], kann dieses Verfahren gegenwärtig in Togo noch nicht durch FNA ersetzt werden. Weitere Schulungen in der FNA-Abnahmetechnik sind zu empfehlen.

Bei Wundabstrichen und Stanzbiopsien resultierten gezieltes Fehlermanagement und regelmäßige Supervisionen vor Ort in exzellenter Probenqualität aufgrund von Anwendung professioneller Probenabnahmetechniken. So war es im dritten Studienjahr möglich, einen klinischen BUD-Verdachtsfall mit nur einer diagnostischen Probe mittels IS2404 PCR-Diagnostik zu bestätigen; entsprechend den aktuellen WHO Empfehlungen reicht bei eindeutiger klinischer Diagnose ein positives PCR-Ergebnis zur Einleitung der Behandlung aus [63].

5.2 Methodentransfer und Schulungen

Der Etablierung einer labortechnisch basierten Diagnostik ging die Etablierung standardisierter Probenabnahmetechniken in Togo voraus. Die Methodik wurde in modifizierter Form von einem EU-geförderten Kooperationsprojekt zwischen der AITM und dem KCCR, Kumasi, Ghana (project no. INCO-CT-2005-015476-BURULICO) übernommen [36, 46-48, 50, 86, 99]; der Ausbildungsstand des togoischen Personals vor Ort erforderte jedoch – wie von der eigenen und anderen Arbeitsgruppen bereits für andere Projekte beschrieben [86, 93, 105] - zunächst die Durchführung intensiver

Schulungen sowie die Implementierung von externer Qualitätssicherung und Fehlermanagement sämtlicher für die Labordiagnostik relevanter Prozesse.

In acht theoretischen und 20 praktischen vor Ort durchgeführten Schulungen in klinischer Diagnostik und Probenabnahme, insbesondere durch gemeinsame Re-Evaluationen labordiagnostisch bestätigter und nicht-bestätigter Patienten konnte, wie unter 5.1.4 beschrieben, die PCR-Fallbestätigungsrate kontinuierlich gesteigert werden.

Die Effizienz von Schulungen und Sensibilisierungsaktionen zeigte sich auch in der zunehmenden Detektion von nicht-ulzerativen Frühmanifestationen der BUD sowie in der erheblichen Verkürzung der Krankheitsdauer bis zur Erstvorstellung der BUD-Fälle in den Behandlungszentren. Somit konnte die durchschnittliche Krankheitsdauer vor Therapiebeginn während der dreijährigen Studiendauer um ungefähr 200 Tage reduziert werden.

5.3 Beitrag der BUD-Diagnostik zur Epidemiologie

Die Lokalisation der Läsionen (hauptsächlich an Extremitäten) sowie die Altersgruppe der Betroffenen (hauptsächlich Kinder bis 15 Jahre) entsprechen den Ergebnissen anderer Studien [5, 18, 31, 35, 56].

Meyers et al. beschrieben 1996 die ersten beiden labordiagnostisch bestätigten BUD-Fälle aus Togo, welche aus den Bezirken Vo und Yoto, Region Maritime stammten [84]. 93,6% aller bestätigten BUD-Fälle der aktuellen Studie stammten aus den benachbarten, durch den Fluss Haho getrennten Bezirken Yoto und Zio, innerhalb der Region Maritime. Da sich bereits in der Frühphase der vorliegenden Studie die genannten Bezirke als hochendemische BUD-Gebiete herauskristallisierten, wurden die CLT's gezielt auf das vermehrte BUD-Vorkommen in diesen Gegenden hingewiesen und mit entsprechenden Karten ausgestattet. Innerhalb des dreijährigen Beobachtungszeitraums wurden die Bewohner dieser ausgewiesenen Gebiete im Verhältnis zu den anderen Bezirken daher häufiger besucht und untersucht, weshalb aus den erhobenen Daten keinesfalls die tatsächliche Prävalenz der BUD innerhalb der gesamten Region Maritime abzuleiten ist.

Während die Transmission von *M. ulcerans* bislang ungeklärt ist, ergaben zahlreiche epidemiologische Studien, dass Baden und Waten in natürlichen Wasserquellen, wie Sümpfen oder langsam fließenden bis stehenden Gewässern, als unmittelbare Risikofaktoren gelten [8, 11, 25, 31, 33-35, 106, 107]. So wurde auch in der vorliegenden Arbeit die Lage der Wohnung der BUD-Fälle in Beziehung zu natürlichen Wasservorkommen gesetzt und es konnte gezeigt werden, dass über 92% der BUD-Fälle in unmittelbarer Nähe von Flüssen und Sümpfen lebten und diese zur Wasserversorgung nutzen.

Das Phänomen der fokalen Verteilung der BUD-Fälle wurde bereits mehrfach beschrieben [22, 23, 31]. Auch in der vorliegenden Studie wurden mehrere benachbarte Ansiedlungen mit einer Anhäufung von BUD-Fällen ermittelt. In gegenüberliegenden Dörfern wurden auf einer Gesamtfläche von 24 km² entlang der westlichen (Zio) (2km x 6km) und östlichen (Yoto) (2 km x 6 km) Uferseite des Flusses Haho über 62% der BUD-Fälle detektiert. Die BUD-Falldistribution im Bezirk Yoto zeigte ein ausschließlich fokales Muster, während in Zio, dem größten Bezirk der Region Maritime, eine disseminierte Fallverteilung vorlag.

In einer 2010 von Sopoh et al. veröffentlichten Studie aus Allada, Benin wurden Daten zu Verwandtschaft, Ehen von Blutsverwandten sowie Kontakthäufigkeit mit natürlichen Wasserquellen

der BUD-Fälle erhoben. Dabei konnte bei Individuen aus gleicher Familie mit täglichem Wasserkontakt ein signifikant höheres BUD-Infektionsrisiko beschrieben werden [31]. Auch unter den togoischen BUD-Fällen konnten insgesamt fünf Geschwisterpaare ausfindig gemacht werden, wobei drei Geschwisterpaare im gleichen Zeitraum BUD entwickelten. Die Ergebnisse beider Studien legen somit nahe, dass nicht nur Risikoverhalten wie beispielsweise häufiger Wasserkontakt, sondern auch genetische Disposition die Wahrscheinlichkeit einer BUD-Erkrankung erhöhen. Da die Verwandtschaft der BUD-Patienten zueinander in beiden Studien nur anamnestisch erfragt und nicht mittels genetischer Analysen gesichert wurde, keine Kontrollen mitgeführt wurden, und darüber hinaus für die Patienten aufgrund des gleichen Lebensumfeldes auch ein vergleichbares Expositionsrisiko anzunehmen ist, sollte die Hypothese der genetischen Disposition in weiteren Studien verifiziert werden.

Die Frage, weshalb in einer Bevölkerungsgruppe, die in der gleichen geographischen Lage mit den gleichen verhaltensbedingten Risikofaktoren leben, bestimmte Personen erkranken, andere aber nicht, bleibt bislang ungelöst. Für andere mykobakterielle Erkrankungen wie z.B. Lepra, Tuberkulose aber auch andere Infektionen durch nicht-tuberkulöse Mykobakterien wurde bereits der Nachweis genetischer Polymorphismen geführt, die mit einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber diesen Erkrankungen einhergehen. Es handelt sich hierbei vorwiegend um Polymorphismen die zu phänotypischen Defekten der Enzyme des Interleukin-12-Interferon Gamma (INF- γ) Signalübertragungsweges führen und so mit einer verminderten Produktion des protektiven INF- γ einhergehen [108, 109]. Die Annahme der Beeinflussung der BUD-Manifestation durch humangenetische Faktoren, ebenso wie die Hypothese des „familiar clustering“, die sich auf Beobachtung der familiären Häufung von BUD-Fällen stützt, weisen die Richtung künftiger epidemiologischer Forschungsziele [31, 50, 109].

6 Folgestudie und Ausblick

Im Januar 2011 wurde mit der dreiphasigen Implementierung des Nationalen Referenzlabors für BUD im „Institut National d'Hygiene“ (INH) in Lomé, Togo, in Kollaboration mit der AITM als externes Referenzlabor, im Zuge des EU-geförderten FP7-Projektes BuruliVac („Identification and development of vaccine candidates for Buruli Ulcer Disease“; Grant agreement number: 241500), begonnen.

Praktische Schulungen, gezieltes Fehlermanagement sowie regelmäßige Supervisionen in sämtlichen labordiagnostischen Prozessen resultierten - im Vergleich zur vorliegenden Studie – in einem deutlichen Anstieg der Konkordanzraten der Mikroskopie- und PCR-Ergebnisse der involvierten Labore sowie weiterer Reduktion der Krankheitsdauer der BUD-Fälle vor Erstvorstellung [99].

Entsprechend aktueller WHO-Empfehlungen (persönliche Kommunikation, Dr. Kingsley Asiedu, GBUI, WHO Annual meeting on Buruli ulcer, Genf, März 2013) sollten 70% der BUD-Fälle endemischer Länder mittels PCR bestätigt werden [64]. Wie jüngst durch die eigene Arbeitsgruppe gezeigt, konnte im Rahmen der Implementierung des BUD-Referenzlabors im INH bereits eine PCR-Bestätigung über 78% erreicht werden [99].

7 Zusammenfassung

Die Buruli-Ulkus-Erkrankung (engl.: Buruli ulcer disease, BUD) ist eine durch das *Mycobacterium ulcerans* verursachte Infektionskrankheit der Haut und des subkutanen Fettgewebes. Ausgehend von nicht-ulzerativen Formen entstehen im weiteren Krankheitsverlauf großflächige schmerzlose Ulzerationen, die aufgrund ausgedehnter Narbenbildung zu erheblichen Behinderungen führen können. Vor Beginn der achtwöchigen antimykobakteriellen Kombinationstherapie ist gemäß WHO-Richtlinien eine gesicherte, vorzugsweise molekulare Labordiagnose erforderlich. Mangelhafte Laborausstattung und Mangel an ausgebildetem Laborpersonal erschweren jedoch die Implementierung insbesondere molekularer Diagnostikmethoden in endemischen Regionen.

Im Rahmen einer 2007 initiierten Kooperation zwischen DAHWT, CHR, PNLUB und AITM wurden mittels Schulungen für medizinisches Personal, Sensibilisierungsaktionen für die Bevölkerung betroffener Regionen, sowie der Anwendung standardisierter Verfahren zur Probenabnahme, Dokumentation und externer Qualitätskontrolle erstmals die Voraussetzungen für die Implementierung einer systematischen BUD-Labordiagnostik in Togo geschaffen.

Die Fallbestätigungsrate der mikroskopischen Diagnostik war mit etwa 30% vergleichsweise gering. Externe Qualitätssicherungsmaßnahmen seitens der AITM zeigten aufgrund eines hohen Anteils falsch negativer Ergebnisse der togoischen Labore sowie methodischer Fehler hinsichtlich Herstellung, Auswertung und Lagerung der Präparate einen erheblichen Schulungsbedarf auf.

Im dreijährigen Studienverlauf wurden insgesamt 54% aller BUD-Verdachtsfälle mittels konventioneller IS2404 PCR als BUD-Fälle bestätigt. Kontinuierliches Fehlermanagement und gezielte Schulungen in klinischer Diagnose und Probenabnahme konnten die initial niedrigen PCR-Fallbestätigungsraten von 43% im ersten auf über 69% im dritten Studienjahr steigern. Trotz teilweise unvollständiger Probensets ermöglichte die exzellente Qualität des vorhandenen diagnostischen Materials die Laborbestätigung aller Verdachtsfälle. Darüber hinaus wurden im Studienverlauf zunehmend BUD-Fälle mit Früh-Manifestationen detektiert, somit die Krankheitsdauer vor Erstvorstellung und Therapiebeginn um durchschnittlich 200 Tage reduziert.

In Übereinstimmung mit den Erkenntnissen epidemiologischer Studien aus anderen endemischen Regionen stammte auch in Togo die Mehrzahl der Fälle aus der Altersgruppe der unter 15-jährigen, es lag ein fokales (Distrikt Yoto) bzw. disseminiertes (Distrikt Yoto) Fallverteilungsmuster vor und über 90 % der Patienten lebten in unmittelbarer Nähe von Gewässern. Im togoischen Patientenkollektiv befanden sich zudem fünf Geschwisterpaare.

Umfangreiche Schulungen in klinischer Diagnostik, standardisierter Probenabnahme und Datenmanagement, sowie die Etablierung externer Qualitätskontrollmaßnahmen ermöglichten die in dieser Arbeit beschriebene erstmalige systematische Durchführung konventioneller und molekularer Labordiagnostik für togoische BUD-Verdachtsfälle. Die Ergebnisse dieser Studie waren wegweisend für die Optimierung sämtlicher, die Labordiagnostik betreffender Prozesse im Rahmen der erfolgreichen Implementierung eines Nationalen BUD-Referenzlabors in Togo.

8 Literaturverzeichnis

1. Beissner, M., K.H. Herbinger, and G. Bretzel, *Laboratory diagnosis of Buruli ulcer disease*. Future Microbiol, 2010. **5**(3): p. 363-70.
2. WHO, *Annual Meeting on Buruli Ulcer, 22-24 March 2010*. Summary Report TAG Meeting 2010, 2010.
3. WHO, *Management of Mycobacterium ulcerans disease*. A manual for health care providers, ed. J.A. Buntine and K. Crofts. Vol. 1. 2001, Geneva: WHO. 72.
4. WHO, *Buruli ulcer: progress report, 2004 - 2008*. Weekly epidemiological record, 2008 **17**(83), 2008: p. 145 - 154.
5. WHO, *Buruli ulcer disease (Mycobacterium ulcerans infection)*. Fact sheet N° 199, 2007.
6. Jenkin, G.A., et al., *Acute, oedematous Mycobacterium ulcerans infection in a farmer from far north Queensland*. Med J Aust, 2002. **176**(4): p. 180-1.
7. Johnson, P.D., et al., *The emergence of Mycobacterium ulcerans infection near Melbourne*. Med J Aust, 1996. **164**(2): p. 76-8.
8. Bamberger, D., et al., *Fighting mycobacterial infections by antibiotics, phytochemicals and vaccines*. Microbes and infection / Institut Pasteur, 2010.
9. Barker, D.J., *Buruli disease in a district of Uganda*. J Trop Med Hyg, 1971. **74**(12): p. 260-4.
10. WHO, *Buruli ulcer disease*. Wkly Epidemiol Rec, 2004. **79**(15): p. 145-9.
11. Walsh, D.S., F. Portaels, and W.M. Meyers, *Buruli ulcer: Advances in understanding Mycobacterium ulcerans infection*. Dermatologic clinics, 2011. **29**(1): p. 1-8.
12. WHO, *Provisional guidance on the role of specific antibiotics in the management of Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer)*. Vol. 33. 2004, Geneva: WHO.
13. WHO, *Cotonou Declaration on Buruli Ulcer*. WHO 2009.
14. Huygen, K., et al., *Buruli ulcer disease: prospects for a vaccine*. Med Microbiol Immunol, 2009. **198**(2): p. 69-77.
15. WHO, *Summary report of the WHO annual meeting on Buruli ulcer, 2-4 April 2007 and Report of the Technical Adversory Group (TAG) meeting, 5 April 2007*. WHO, 2007.
16. Kanga, J.M. and E.D. Kacou, *[Epidemiological aspects of Buruli ulcer in Cote d'Ivoire: results of a national survey]*. Bull Soc Pathol Exot, 2001. **94**(1): p. 46-51.
17. WHO, *Buruli ulcer: first programme review meeting for west Africa--summary report*. Wkly Epidemiol Rec, 2009. **84**(6): p. 43-8.
18. Walsh, D.S., F. Portaels, and W.M. Meyers, *Recent advances in leprosy and Buruli ulcer (Mycobacterium ulcerans infection)*. Curr Opin Infect Dis, 2010. **23**(5): p. 445-55.
19. Francis, G., M. Whitby, and M. Woods, *Mycobacterium ulcerans infection: a rediscovered focus in the Capricorn Coast region of central Queensland*. Med J Aust, 2006. **185**(3): p. 179-80.
20. Schunk, M., et al., *Outcome of patients with buruli ulcer after surgical treatment with or without antimycobacterial treatment in Ghana*. Am J Trop Med Hyg, 2009. **81**(1): p. 75-81.
21. Ministère de la Santé, R.T., *PLAN STRATEGIQUE PNLUB-LP 2011-2015*. 2010: p. 22.
22. Johnson, R.C., et al., *Buruli ulcer distribution in Benin*. Emerg Infect Dis, 2005. **11**(3): p. 500-1.
23. Amofah, G., et al., *Buruli ulcer in Ghana: results of a national case search*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(2): p. 167-70.
24. Fyfe, J.A., et al., *A major role for mammals in the ecology of Mycobacterium ulcerans*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(8): p. e791.
25. Portaels, F., et al., *First cultivation and characterization of Mycobacterium ulcerans from the environment*. PLoS Negl Trop Dis, 2008. **2**(3): p. e178.
26. Roltgen, K., et al., *Single nucleotide polymorphism typing of Mycobacterium ulcerans reveals focal transmission of buruli ulcer in a highly endemic region of Ghana*. PLoS neglected tropical diseases, 2010. **4**(7): p. e751.

27. Walsh, D.S., F. Portaels, and W.M. Meyers, *Buruli ulcer (Mycobacterium ulcerans infection)*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2008. **102**(10): p. 969-78.
28. Toll, A., et al., *Aggressive multifocal Buruli ulcer with associated osteomyelitis in an HIV-positive patient*. *Clin Exp Dermatol*, 2005. **30**(6): p. 649-51.
29. Johnson, R.C., et al., *Association of HIV infection and Mycobacterium ulcerans disease in Benin*. *AIDS*, 2008. **22**(7): p. 901-3.
30. Sopoh, G., Dossou A., Brun L., Barogui Y., Houézo J., Affolabi D., et al., *Case Report: Severe Multifocal Form of Buruli Ulcer after Streptomycin and Rifampicin Treatment: Comments on Possible Dissemination Mechanisms*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 2010: p. pp. 307 - 313.
31. Sopoh, G.E., et al., *Family relationship, water contact and occurrence of Buruli ulcer in Benin*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010. **4**(7): p. e746.
32. Stinear, T. and P.D. Johnson, *First isolation of Mycobacterium ulcerans from an aquatic environment: the end of a 60-year search?* *PLoS neglected tropical diseases*, 2008. **2**(3): p. e216.
33. Williamson, H.R., et al., *Distribution of Mycobacterium ulcerans in buruli ulcer endemic and non-endemic aquatic sites in Ghana*. *PLoS neglected tropical diseases*, 2008. **2**(3): p. e205.
34. Gryseels, S., et al., *Amoebae as potential environmental hosts for Mycobacterium ulcerans and other mycobacteria, but doubtful actors in Buruli ulcer epidemiology*. *PLoS neglected tropical diseases*, 2012. **6**(8): p. e1764.
35. Bratschi, M.W., et al., *Geographic distribution, age pattern and sites of lesions in a cohort of Buruli ulcer patients from the Mape Basin of Cameroon*. *PLoS neglected tropical diseases*, 2013. **7**(6): p. e2252.
36. Beissner, M., et al., *A genotypic approach for detection, identification, and characterization of drug resistance in Mycobacterium ulcerans in clinical samples and isolates from Ghana*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2010. **83**(5): p. 1059-65.
37. WHO, *Diagnosis of Mycobacterium ulcerans disease. A manual for health care providers*, ed. F. Portaels, P. Johnson, and W. Meyers. Vol. 1. 2001, Geneva: WHO. 92.
38. Stinear, T.P., et al., *Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of Mycobacterium ulcerans, the causative agent of Buruli ulcer*. *Genome Res*, 2007. **17**(2): p. 192-200.
39. Kaser, M., et al., *Evolution of two distinct phylogenetic lineages of the emerging human pathogen Mycobacterium ulcerans*. *BMC evolutionary biology*, 2007. **7**: p. 177.
40. Kaser, M., et al., *Lack of insertional-deletional polymorphism in a collection of Mycobacterium ulcerans isolates from Ghanaian Buruli ulcer patients*. *J Clin Microbiol*, 2009. **47**(11): p. 3640-6.
41. Stragier, P., et al., *VNTR analysis differentiates Mycobacterium ulcerans and IS2404 positive mycobacteria*. *Systematic and applied microbiology*, 2007. **30**(7): p. 525-30.
42. Mve-Obiang, A., et al., *A newly discovered mycobacterial pathogen isolated from laboratory colonies of Xenopus species with lethal infections produces a novel form of mycolactone, the Mycobacterium ulcerans macrolide toxin*. *Infect Immun*, 2005. **73**(6): p. 3307-12.
43. Mve-Obiang, A., et al., *Heterogeneity of mycolactones produced by clinical isolates of Mycobacterium ulcerans: implications for virulence*. *Infect Immun*, 2003. **71**(2): p. 774-83.
44. van der Werf, T.S., et al., *Mycolactones and Mycobacterium ulcerans disease*. *Lancet*, 2003. **362**(9389): p. 1062-4.
45. Silva, M.T., F. Portaels, and J. Pedrosa, *Pathogenetic mechanisms of the intracellular parasite Mycobacterium ulcerans leading to Buruli ulcer*. *Lancet Infect Dis*, 2009. **9**(11): p. 699-710.
46. Bretzel, G., et al., *A stepwise approach to the laboratory diagnosis of Buruli ulcer disease*. *Trop Med Int Health*, 2007. **12**(1): p. 89-96.
47. Herbigner, K.H., et al., *Comparative study of the sensitivity of different diagnostic methods for the laboratory diagnosis of Buruli ulcer disease*. *Clin Infect Dis*, 2009. **48**(8): p. 1055-64.

48. Siegmund, V., et al., *Dry reagent-based polymerase chain reaction compared with other laboratory methods available for the diagnosis of Buruli ulcer disease*. Clin Infect Dis, 2007. **45**(1): p. 68-75.
49. Nienhuis, W.A., Stienstra, Y., Thompson, W. A., Awuah, P. C., et al., *Antimicrobial treatment for early, limited Mycobacterium ulcerans infection: a randomised controlled trial*. the lancet, 2010. **published online February 4, 2010**: p. 1 -09.
50. Bretzel, G., et al., *Laboratory confirmation of buruli ulcer disease in togo, 2007-2010*. PLoS neglected tropical diseases, 2011. **5**(7): p. e1228.
51. Sarfo, F.S., et al., *Clinical efficacy of combination of rifampin and streptomycin for treatment of Mycobacterium ulcerans disease*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2010. **54**(9): p. 3678-85.
52. van der Werf, T.S., et al., *Mycobacterium ulcerans infection*. Lancet, 1999. **354**(9183): p. 1013-8.
53. Gordon, C.L., et al., *Spontaneous Clearance of Mycobacterium ulcerans in a Case of Buruli Ulcer*. PLoS neglected tropical diseases, 2011. **5**(10): p. e1290.
54. Ellen, D.E., et al., *Assessment of functional limitations caused by Mycobacterium ulcerans infection: towards a Buruli ulcer functional limitation score*. Trop Med Int Health, 2003. **8**(1): p. 90-6.
55. Kibadi, K., et al., *Response to treatment in a prospective cohort of patients with large ulcerated lesions suspected to be Buruli Ulcer (Mycobacterium ulcerans disease)*. PLoS neglected tropical diseases, 2010. **4**(7): p. e736.
56. WHO, *Buruli Ulcer: Prevention of Disability (POD)* ed. L. L., et al.2006, Geneva: WHO.
57. Barogui, Y., et al., *Functional limitations after surgical or antibiotic treatment for Buruli ulcer in Benin*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 2009. **81**(1): p. 82-7.
58. Phanzu, D.M., et al., *Effect of a control project on clinical profiles and outcomes in buruli ulcer: a before/after study in Bas-Congo, Democratic Republic of Congo*. PLoS neglected tropical diseases, 2011. **5**(12): p. e1402.
59. Agbenorku, P., et al., *Buruli-ulcer induced disability in ghana: a study at apromase in the ashanti region*. Plastic surgery international, 2012. **2012**: p. 752749.
60. Agbenorku, P., *Multicenter study of buruli ulcer disabilities in the head and neck region*. Plastic surgery international, 2011. **2011**: p. 647418.
61. van der Werf, T.S., et al., *Mycobacterium ulcerans disease*. Bull World Health Organ, 2005. **83**(10): p. 785-91.
62. Phanzu, D.M., Bafende E.A., Imposo BB., et al., *Undertreated negrotizing fasciitis masquerading as ulcerated edematous Mycobacterium ulcerans infection (Buruli ulcer)*. Am J Trop Med Hyg, 2010: p. 478-81.
63. WHO, *Guidance on sampling techniques for laboratory-confirmation of Mycobacterium ulcerans infection (Buruli ulcer disease)*. 2010.
64. WHO, *Laboratory Diagnosis of Buruli Ulcer A Manual for Health-Care Providers*. 2013.
65. Affolabi, D., et al., *Effects of decontamination, DNA extraction and amplification procedures on the molecular diagnosis of Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer)*. Journal of clinical microbiology, 2012.
66. Affolabi, D., et al., *Effects of grinding surgical tissue specimens and smear staining methods on Buruli ulcer microscopic diagnosis*. Trop Med Int Health, 2008. **13**(2): p. 187-90.
67. Yeboah-Menu D., A.-P.A., Asan-Ampah K., Ampadu ED., Pluschke G., et al. , *Combining PCR with microscopy to reduce costs of laboratory diagnosis of Buruli ulcer*. Am J Trop Med Hyg, 2011.
68. Eddyani, M. and F. Portaels, *Survival of Mycobacterium ulcerans at 37 degrees C*. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2007. **13**(10): p. 1033-5.
69. Eddyani, M., et al., *Primary culture of Mycobacterium ulcerans from human tissue specimens after storage in semisolid transport medium*. Journal of clinical microbiology, 2008. **46**(1): p. 69-72.

70. Phillips, R., et al., *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, 2005. **43**(8): p. 3650-6.
71. Stinear, T., et al., *A simple PCR method for rapid genotype analysis of Mycobacterium ulcerans.* J Clin Microbiol, 2000. **38**(4): p. 1482-7.
72. Stinear, T., et al., *Identification and characterization of IS2404 and IS2606: two distinct repeated sequences for detection of Mycobacterium ulcerans by PCR.* J Clin Microbiol, 1999. **37**(4): p. 1018-23.
73. Debacker, M., et al., *Buruli ulcer recurrence, Benin.* Emerg Infect Dis, 2005. **11**(4): p. 584-9.
74. Sizaire, V., et al., *Mycobacterium ulcerans infection: control, diagnosis, and treatment.* Lancet Infect Dis, 2006. **6**(5): p. 288-96.
75. Herbinger, K.H., et al., *Excision of pre-ulcerative forms of Buruli ulcer disease: a curative treatment?* Infection, 2009. **37**(1): p. 20-5.
76. Bretzel, G., et al., *Post-surgical assessment of excised tissue from patients with Buruli ulcer disease: progression of infection in macroscopically healthy tissue.* Trop Med Int Health, 2005. **10**(11): p. 1199-206.
77. Rondini, S., et al., *Contiguous spread of Mycobacterium ulcerans in Buruli ulcer lesions analysed by histopathology and real-time PCR quantification of mycobacterial DNA.* J Pathol, 2006. **208**(1): p. 119-28.
78. Chauty, A., et al., *Oral treatment for Mycobacterium ulcerans infection: results from a pilot study in Benin.* Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2011. **52**(1): p. 94-6.
79. Alffenaar, J.W., et al., *Pharmacokinetics of rifampin and clarithromycin in patients treated for Mycobacterium ulcerans infection.* Antimicrobial agents and chemotherapy, 2010. **54**(9): p. 3878-83.
80. Junghanss, T., et al., *Phase change material for thermotherapy of Buruli ulcer: a prospective observational single centre proof-of-principle trial.* PLoS Negl Trop Dis, 2009. **3**(2): p. e380.
81. McGaw, L.J., et al., *The potential of South African plants against Mycobacterium infections.* Journal of ethnopharmacology, 2008. **119**(3): p. 482-500.
82. Okunade, A.L., M.P. Elvin-Lewis, and W.H. Lewis, *Natural antimycobacterial metabolites: current status.* Phytochemistry, 2004. **65**(8): p. 1017-32.
83. Songne, B., et al., *[Buruli ulcer in Togo: 21 cases].* Presse Med, 2001. **30**(11): p. 533.
84. Meyers, W.M., et al., *Mycobacterium ulcerans infection (Buruli ulcer): first reported patients in Togo.* Br J Dermatol, 1996. **134**(6): p. 1116-21.
85. James, K., et al., *[Buruli ulcer in Togo: a hospital study].* Sante, 2003. **13**(1): p. 43-7.
86. Bretzel, G., et al., *External quality assurance for the laboratory diagnosis of Buruli ulcer disease in Ghana.* Trop Med Int Health, 2006. **11**(11): p. 1688-93.
87. Herbinger, K.H., et al., *Efficiency of Fine Needle Aspiration Compared with other Sampling Techniques for the Laboratory Diagnosis of Buruli Ulcer Disease.* J Clin Microbiol, 2010.
88. Sanjay Rajpal, V.K.D., *Sputum grading as predictor of treatment outcome in pulmonary tuberculosis.* Ind.J Tub., 2002: p. 139 - 143.
89. Siegmund, V., et al., *Dry-reagent-based PCR as a novel tool for laboratory confirmation of clinically diagnosed Mycobacterium ulcerans-associated disease in areas in the tropics where M. ulcerans is endemic.* J Clin Microbiol, 2005. **43**(1): p. 271-6.
90. Stinear, T., et al., *Identification of Mycobacterium ulcerans in the environment from regions in Southeast Australia in which it is endemic with sequence capture-PCR.* Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(8): p. 3206-13.
91. Kaattari, I.M., et al., *The evolving story of Mycobacterium tuberculosis clade members detected in fish.* J Fish Dis, 2006. **29**(9): p. 509-20.
92. N'Guessan, K., et al., *[Value and limits of microscopy of exudates in Mycobacterium ulcerans cutaneous infection in Cote d'Ivoire].* Bull Soc Pathol Exot, 2001. **94**(1): p. 9-10.

-
93. Affolabi, D., et al., *Setting up a national reference laboratory for Buruli ulcer: the case of Benin*. Trop Med Int Health, 2008. **13**(3): p. 365-8.
 94. Mensah-Quainoo, E., et al., *Diagnosis of Mycobacterium ulcerans infection (Buruli ulcer) at a treatment centre in Ghana: a retrospective analysis of laboratory results of clinically diagnosed cases*. Tropical medicine & international health : TM & IH, 2008. **13**(2): p. 191-8.
 95. Fyfe, J.A., et al., *Development and application of two multiplex real-time PCR assays for the detection of Mycobacterium ulcerans in clinical and environmental samples*. Applied and environmental microbiology, 2007. **73**(15): p. 4733-40.
 96. Rondini, S., et al., *Development and application of real-time PCR assay for quantification of Mycobacterium ulcerans DNA*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(9): p. 4231-7.
 97. Njiru, Z.K., et al., *Rapid and Sensitive Detection of Mycobacterium ulcerans by Use of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Test*. Journal of clinical microbiology, 2012. **50**(5): p. 1737-41.
 98. Beissner M., P.R., Maman I., Awua-Boateng NY., Huber K., Sarfo S., Sybank D., Jansson M., Wawrzeczko A., Amekuse K., Nitschke J., Wiedemann F., Battke F., Badziklou K., Adjei O., Löscher T., Banla Kere A., Bretzel G., *Comparative Study on Different DNA Amplification Techniques (LAMP, Real-Time and conventional PCR) for the Molecular Diagnosis of Buruli Ulcer Disease*. 2012.
 99. Beissner, M., et al., *Implementation of a national reference laboratory for buruli ulcer disease in togo*. PLoS neglected tropical diseases, 2013. **7**(1): p. e2011.
 100. de Souza, D.K., et al., *A quick and cost effective method for the diagnosis of Mycobacterium ulcerans infection*. BMC infectious diseases, 2012. **12**: p. 8.
 101. Ablordey, A., et al., *Detection of Mycobacterium ulcerans by the Loop Mediated Isothermal Amplification Method*. PLoS neglected tropical diseases, 2012. **6**(4): p. e1590.
 102. Eddyani, M., et al., *Fine-needle aspiration, an efficient sampling technique for bacteriological diagnosis of nonulcerative Buruli ulcer*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(6): p. 1700-4.
 103. Cassisa V., C.A., Marion E, Ardant MF, Eyangoh S, et al. , *Use of fine-needle aspiration for diagnosis of Mycobacterium ulcerans infection*. J Clin Microbiol, 2010. **48**: p. 2263 - 2264.
 104. Phillips, R.O., et al., *Sensitivity of PCR targeting Mycobacterium ulcerans by use of fine-needle aspirates for diagnosis of Buruli ulcer*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(4): p. 924-6.
 105. APHL, et al., *External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy*. Vol. 1. 2002, Washington, D.C.: APHL. 111.
 106. Marion, E., et al., *Geographic expansion of Buruli ulcer disease, Cameroon*. Emerging Infectious Diseases, 2011. **17**(3): p. 551-3.
 107. Sopoh, G.E., et al., *Buruli ulcer prevalence and altitude, Benin*. Emerging Infectious Diseases, 2011. **17**(1): p. 153-4.
 108. Casanova, J.L. and L. Abel, *Human genetics of infectious diseases: a unified theory*. The EMBO journal, 2007. **26**(4): p. 915-22.
 109. Stienstra, Y., et al., *Susceptibility to Buruli ulcer is associated with the SLC11A1 (NLRP1) D543N polymorphism*. Genes Immun, 2006. **7**(3): p. 185-9.

9 Danksagung

Frau Privatdozentin Dr. G. Bretzel danke ich sehr für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die Heranführung an die Thematik, die Ermöglichung der praktischen Einsätze in Togo, die herausragende wissenschaftliche Betreuung sowie für die Aufnahme in die Buruli Ulkus Arbeitsgruppe. Ich habe sehr viel Unterstützung durch ihren hilfreichen Beistand in Rat und Tat erfahren! Vielen Dank!

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. T. Löscher für die freundliche Aufnahme in der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München, sein stetes Interesse an Entwicklung und Fortgang dieser Arbeit sowie seine Gesprächsbereitschaft während der ganzen Schaffenszeit.

Bei Dr. Adolf Diefenhardt, dem damaligen ärztlichen Leiter der DAHW, Würzburg sowie bei Fr. Carola Mühleisen, DAHW, Würzburg möchte ich mich bedanken, für das Vertrauen und Möglichkeit die Untersuchungen in Togo durchzuführen.

Herrn Dr. Jörg Nitschke danke ich sehr für die stets freundschaftliche Zusammenarbeit während und nach den Togo-Einsätzen und dass er mich immer an seinem chirurgischen Erfahrungsreichtum teilhaben ließ. Danke Jörg, ich konnte sehr viel von Dir lernen!

Ganz besonders möchte ich Herrn Franz Xaver Wiedemann, in seiner Funktion als Repräsentant der DAHW für die außergewöhnlich freundliche Aufnahme, sehr gute Zusammenarbeit und fortwährende Gesprächsbereitschaft danken. Merci beaucoup!

Ich danke der gesamten Belegschaft des BUD-Referenzzentrums CHR Maritime, Tsévié, ganz besonders Monsieur Ebekalisai Piten sowie der Belegschaft des Labors und des Operationstraktes, im besonderen Frau Dr. Nelly Asiobo, für die kollegiale Zusammenarbeit.

Den Mitwirkenden des togoischen Nationalprogramms PNLUB-LP, insbesondere den CLT's für ihren unermüdlichen Einsatz und ihre exzellente Arbeit in diesem Projekt.

Herrn Dr. Marcus Beissner danke ich ganz besonders für die wunderbar freundschaftliche Zusammenarbeit und seine stete Unterstützung. Herzlichen Dank!

Herrn PD. Dr. Karl-Heinz Herbinger danke ich herzlichst für die exzellente Hilfe bei allen statistischen Fragestellungen.

Ich bedanke mich bei allen ärztlichen Mitarbeitern der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin für die freundliche Aufnahme am Institut, bei allen medizinisch/biologisch technischen Assistentinnen, im Besonderen bei Frau Kerstin Helfrich und Erna Fleischmann für die sehr nette Einarbeitung im Labor.

Den Korrekturlesern Ingrid, Richard, Marcus, Mirjam, Günter und Florentine danke ich vielmals!

Ich danke meinen Eltern und meinen Geschwistern, Carmelo und seinen Eltern für ihre Unterstützung! Vielen lieben Dank!

Ganz besonders möchte ich meinen lieben Kindern Moritz und Susanna danken, denen ich diese Arbeit gewidmet habe. Ihr habt mir mit eurer Lebendigkeit immer wieder Kraft gegeben weiterzumachen, ich danke Euch!

10 Publikationen

Beissner M., **Huber K.L.**, Badziklou K., Halatoko W., Maman I., Vogel F., Bidjada B., Piten E., Helfrich K., Mengele C., Nitschke J., Amekuse K., Wiedemann F.X., Diefenhardt A., Kobara B., Herbinger K.H., Banla A., Prince-David M., Löscher T., Bretzel G., Implementation of a National Reference Laboratory for Buruli Ulcer Disease in Togo, PLoS Negl Trop Dis. 2013 Jan;

Beissner M., Phillips R., Maman I., Awua-Boateng NY., **Huber K.**, Sarfo S., Symank D., Jansson M., Wawrzeczko A., Amekuse K., Nitschke J., Wiedemann F., Battke F., Badziklou K., Adjei O., Löscher T., Banla Kere A., Bretzel G., *Comparative Study on Different DNA Amplification Techniques (LAMP, Real-Time and conventional PCR) for the Molecular Diagnosis of Buruli Ulcer Disease.* 2012.

Beissner M., Symank D., Phillips R.O., Amoako Y.A., Awua-Boateng N.Y., Sarfo F.S., Jansson M., **Huber K.L.**, Herbinger K.H., Battke F., Löscher T., Adjei O., Bretzel G. Detection of viable Mycobacterium ulcerans in clinical samples by a novel combined 16S rRNA reverse transcriptase/IS2404 real-time qPCR assay. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6: e1756.

Bretzel G., **Huber K.L.**, Kobara B., Beissner M., Piten E., Herbinger K.H., Wiedemann F.X., Amekuse K., Banla Kere A., Helfrich K., Fleischmann E., Löscher T., Diefenhardt A., Nitschke J., Laboratory confirmation of Buruli ulcer disease in Togo, 2007-2010. PLoS Negl Trop Dis. 2011 Jul;

Herbinger K.H., Beissner M., **Huber K.**, Awua-Boateng N.Y., Nitschke J., Thompson W., Klutse E., Agbenorku P., Assiobo A., Piten E., Wiedemann F., Fleischmann E., Helfrich K., Adjei O., Löscher T., Bretzel G., Efficiency of fine-needle aspiration compared with other sampling techniques for laboratory diagnosis of Buruli ulcer disease. J Clin Microbiol. 2010 Oct;

Poster


Huber K.L., Beissner M., Piten E., Maman I., Helfrich K., Mengele C., Bidjada B., Vogel F., Nitschke J., Wiedemann F., Herbinger K.H., Amekuse K., Badziklou K., Banla Kere A., Diefenhardt A., Kobara B., Löscher T., Bretzel G. External Quality Assurance for the Laboratory Diagnosis of Buruli Ulcer Disease in Togo. 102. Annual Meeting of the German Society for Tropical Medicine and International Health. Heidelberg, Germany, 2012.

Beissner M., Phillips R., Maman I., Awua-Boateng N.Y., Sarfo F.S., **Huber K.L.**, Symank D., Jansson M., Wawrzeczko A., Amekuse K., Nitschke J., Wiedemann F., Battke F., Badziklou K., Adjei O., Löscher T., Banla Kere A., Bretzel G. Comparative Study on Different DNA Amplification Techniques (LAMP, Real-Time and Conventional PCR) for the Molecular Diagnosis of Buruli Ulcer Disease. 102. Annual Meeting of the German Society for Tropical Medicine and International Health. Heidelberg, Germany, 2012.

Herbinger K.H., **Huber K.**, Awua-Boateng N.Y., Nitschke J., Thompson W., Klutse E., Agbenorku P., Assiobo A., Piten E., Wiedemann F., Beissner M., Fleischmann E., Helfrich K., Adjei O., Löscher T., Bretzel G. Fine Needle Aspiration Compared with other Sampling Techniques for the Diagnosis of Buruli Ulcer Disease. 101. Annual Meeting of the German Society for Tropical Medicine and International Health. Munich, Germany, 2009.

11 Anhang

CENTRE HOSPITALIERE REGIONAL MARITIME . B.P. 51 – TSEVIE – TELEPHONE +228-330.41.35



Ministère de la Santé

CHR – TSEVIE
 HOPITAL REGIONAL MARITIME
 CENTRE DE REFERENCE NATIONAL ET
 DE TRAITEMENT DE ULCERE DE BURULI
 TOGO

Déclaration d'Accord de Patient

Patient :

Nom	Prénoms	Date de naissance
Adresse	Ville/Village	Région

A présent je déclare expressément que dans le cadre de la hospitalisation/prise en charge/diagnostic et pendant le traitement je suis d'accord que/avec :

- des prélèvements nécessaire dans le cadre de diagnostic, Recherche et traitement sont pris (biopsie, chirurgical, sanguine)
- des prélèvements sanguine en général
- l'utilisation des échantillons et prélèvements dans le cadre de la recherche
- le traitement prescrit par les médecins traitants
- l'envoi des prélèvements dans les instituts médicaux externes
- avec tous les actions nécessaires, aussi chirurgicale, dans le cadre de mon traitement

J'ai été informé que les prélèvements seront utilisés pour les publications dans le cadre de la recherche.

Le CHR- Tsevié déclare que les informations du patients restent confidentielles et sont utilisées uniquement dans le cadre professionnelle. Les lois en vigueur sur la confidentialité des données personnelles au Togo sont appliquées.

Lieu et Date	Signature Patient Représentant juridique de patient
--------------	--------------------------------------------------------

Abb. 8: Patienteneinverständniserklärung

MINISTÈRE DE LA SANTE
 DIRECTION GENERALE DE LA SANTE
 DIRECTION DES SOINS DE SANTE PRIMAIRES
 PROGRAMME NATIONAL DE LUTTE CONTRE
 L'ULCERE DE BURULI, LEPRE ET PIAN
 BP : 386, Lomé – Tél/Fax : 221 60 22
 Email : pnlub@yahoo.fr
 N° 13 / 2011/MS/DGS/DSSP/PNLUB-LP

REPUBLIQUE TOGOLAISE
 Travail, Liberté, Paix

Le Programme National de lutte contre l'UB, Lépre et Pian (PNLUB-LP) autorise la DAHW et son Partenaires DITMLMU Munich, Institut National d'Hygiène (INH), Lomé et Centre Hospitalier Régionale Tsevie (CHR) pour l'utilisation des données diagnostiques (UB/01NR) pour les années 2007 à 2010. Les publications de ces données doivent être pseudonymes.

Le PNLUB-LP confirme sur les points suivants:
 L'information pour les patients et le consentement des patients selon le règlement ont été faite verbalement initialement. Cette pratique est légale et toujours en vigueur au Togo. Néanmoins, à partir de janvier 2009, le programme national a mis en place des consentements par écrit.
 Les patients suspects de l'UB ont été informés sur l'utilisation de leurs données dans des documentations et publications.

Lomé, le 07 Mars 2011.


Le Coordonnateur,

 Dr. Y. Agnime ROGARA

Abb. 9: Ethik Abkommen

MINISTÈRE DE LA SANTÉ
DIRECTION GÉNÉRALE DE LA SANTÉ
CENTRE HOSPITALIER RÉGIONAL DE TSÉVIÉ
CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE ET DE
TRAITEMENT DE L'ULCÈRE DE BURULI

REPUBLIQUE TOGOLAISE
Travail-Liberté-Paix

DECLARATION

Selon les pratiques en vigueur au Togo pour le consentement des patients, je confirme que les patients suspects de l'Ulcère de Buruli ont été verbalement informés sur :

- > La nécessité de prélèvement pour le diagnostic de la maladie
- > L'envoi des prélèvements au LMU à Munich
- > L'utilisation des données diagnostiques anonymes pour des publications

Cette pratique est toujours en vigueur. Néanmoins, à partir de janvier 2009, le programme national a mis en place des consentements par écrit.

Tsévié, le 22/02/2011
Le Responsable de pavillon UB/CNRTUB-CHR-Tsévié


Assistant Médical

Ebékali PITEN

Abb. 10: Deklaration der Patientenaufklärung

Togo #7

1. N° de la Fiche
2. N° de la Fiche
3. Prénom et Nom
4. Sexe
5. Date de naissance
6. Profession
7. Adresse
8. District
9. Province/Région/Département
10. Pays

11. Date de diagnostic clinique (jj/mm/aa)
12. Date de cicatrisation complète (jj/mm/aa)

13. Age (en années)
14. Sexe
15. Poids (en kg)
16. Profession

17. Durée de la maladie avant la consultation (en semaines)
18. Recours à la médecine traditionnelle
19. Existence d'une limitation de mouvements articulaires
20. Traitement antérieur à la streptomycine

21. Catégorie I: lésion unique < 5 cm de diamètre
22. Localisation de la (des) lésion(s)
23. Confirmation biologique
24. Type de traitement
25. Dosages

26. Références par
27. Formes cliniques
28. Localisations délicates

29. Résultats
30. Résultats du traitement

Abb. 11: Data entry form Togo

Fiche clinique et thérapeutique pour l'ulcère de Buruli - nouveau cas
UB 01.N

Nom de l'établissement de soins : _____ Date du diagnostic clinique (jj/mm/aa) : ____/____/____
Nom de l'agent responsable des soins : _____ Date de cicatrisation complète (jj/mm/aa) : ____/____/____

Nom du patient : _____ N° de dossier : _____ Age (en années) : _____ Sexe : Masculin Féminin
Adresse (village ou quartier) : _____ District : _____ Poids (en kg) : _____ Profession : _____
Province/Région/Département : _____ Pays : _____

HISTORIQUE CLINIQUE DE LA MALADIE
Durée de la maladie avant la consultation (en semaines) : _____
Recours à la médecine traditionnelle : Oui Non
Existence d'une limitation de mouvements articulaires : Oui Non
Traitement antérieur à la streptomycine : Oui (nombre de jours : _____) Non

REFERE PAR : Visitateur villageois
 Auto-réflexé Ancien patient Noctule (N) Piquet (Q)
 Membre de famille Engeignant Océline (O) Ulcère (U)
 Agent de santé Autre (antécédent) : _____ Ostomyélite (O) Papule (P)

CATEGORIES
 Catégorie I: lésion unique < 5 cm de diamètre
 Catégorie II: lésion unique 5-15 cm de diamètre
 Catégorie III: lésion unique > 15 cm de diamètre, lésions multiples, lésions aux localisations délicates, ostomyélites

LOCALISATION DE LA (DES) LÉSION(S)
 Membre supérieur (MS) Abdomen (AB) Fesses et périnée (FE)
 Membre inférieur (MI) Dos (DO) Thorax (TH) Tête et cou (TC)

LOCALISATIONS DELICATES
 Oreille Sein Organes génitaux externes

CONFIRMATION BIOLOGIQUE
Prélèvement(s) fait(s) : Oui Non Date du(des) prélèvement(s) : ____/____/____
Type(s) de prélèvement(s) : Ecoulement Aspiration par aiguille fine (AAF) Biopsie
Résultats : ZN : Positif Négatif Positif Négatif
 PCR : Positif Négatif Positif Négatif
 Histo : Positif Négatif Positif Négatif

TYPE DE TRAITEMENT (Cocher si applicable) : Pansements Antibiotiques Chirurgie (Date : ____/____/____) Prévention des incapacités

DOSAGES
Rifampicine : _____ (mg) Streptomycine : _____ (g) Autre (préciser) : _____ (mg)

Cocher chaque jour d'une croix (X) après administration des antibiotiques ; si les antibiotiques n'ont pas été administrés, remplir la case avec le symbole Ø

Mois	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	Total

RÉSULTATS DU TRAITEMENT
 1a: Traitement antibiotique terminé 2a: Cicatrisé sans chirurgie 3a: Cicatrisé sans limitation de mouvements articulaires 4a: Retiré pour meilleur traitement
 1b: Traitement antibiotique sans terminé 2b: Cicatrisé avec chirurgie 3b: Cicatrisé avec limitation de mouvements articulaires 4b: Perdu de vue Décédé

Abb. 12: WHO-Form: UB 01 I

Fiche clinique et thérapeutique pour l'ulcère de Buruli - nouveau cas UB 01.N

GUIDE DE DOSAGE						
Poids du patient (en kg)	Rifampicine (300 mg/comprimé)		Streptomycine (1 g/2 ml)		Autre :	
	Dose (mg)	Nombre de comprimés	Dose (g)	Volume (ml)	Dose (mg)	Nombre de comprimés
5 - 10	75	0,25	0,25	0,50		
11 - 20	150	0,50	0,33	0,70		
21 - 30	300	1,00	0,50	1,00		
31 - 39	300	1,00	0,50	1,00		
40 - 54	450	1,50	0,75	1,50		
> 54	600	2,00	1,00	2,00		

Si la streptomycine est contre-indiquée (ex. : grossesse, traitement antérieur à la streptomycine), contacter la coordination du programme national ou un centre de traitement de référence

SUIVI DU PATIENT PENDANT ET APRES LE TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE	
DATE @/mm/aa)	OBSERVATIONS

Abb. 13: WHO-Form: UB 01 II

Nouveau registre UB 02

Mois: 200

Etablissement de soins : _____ District : _____ Région : _____

No.	Date (Semaine)	Nom / Prenom	Age	Sexe	Adresse (village/ quartier)	District	Classification		Firmex(1) (clinique)	Localisation de la lésion (semio)	Categori-	Limitation de mouvement articulaire (oultom)	Prélèvement(s) (oultom)	Traitement antibiotique (oultom)
							N	R						
1														
2														
3														
4														
5														
6														
7														
8														
9														
10														
11														
12														
13														
14														
15														

*Catégorie I : lésion unique ≤ 5 cm de diamètre ; Catégorie II : lésion unique 5 - 15 cm de diamètre ;
Catégorie III : lésion unique > 15 cm de diamètre, lésions multiples, lésions aux localisations délicates, ostéomyélite

Abb. 14: WHO-Form: UB 02

UB 03

**DEMANDE DE CONFIRMATION EN LABORATOIRE
D'UN CAS D'ULCERE DE BURULI**

I. Informations générales

Nom de l'établissement de soins : _____
 Nom de l'agent de santé ayant fait la demande d'analyse : _____
 Nom du patient : _____ N° de dossier : _____
 Age (ans) : _____ Sexe : M F
 Adresse (village ou quartier) : _____ District : _____
 Classification : Nouveau Rechute
 Forme clinique : Nodule (N) Plaque (Q) Escabe (E) Ulcère (U) Ostéomyélite (O)
 Date du prélèvement : _____
 Type de prélèvement : Ecouvillon Aspiration par aiguille fine (AAF) Biopsie

II. Raisons de la demande d'analyse de laboratoire

Nature de(s) l'analyse(s) : ZN PCR Culture Histopathologie

Raisons
 Diagnostic d'un nouveau cas
 Suivi d'un patient pendant le traitement antibiotique (____ semaines de traitement antibiotique)
 Diagnostic d'un cas de rechute (date du dernier traitement antibiotique: date ou mois _____)
 Suivi d'un patient après le traitement antibiotique

III. Résultats

Examens	ZN	PCR	Culture	Histopathologie
Date : / /				
Date : / /				

Commentaires : _____
 Nom de la personne donnant les résultats : _____
 Nom du laboratoire : _____
 Date : _____

* peut inclure un patient ne répondant pas au traitement comme souhaité

Abb. 15: WHO-Form: UB 03

11.1 Herkunftsorte der klinischen BUD-Verdachtsfälle

Herkunftsregion	Herkunftsdestrikt	Herkunftsort	Anzahl der BUD-Verdachtsfälle aufgeteilt nach Läsionsart (n=N)		Anzahl der BUD-Verdachtsfälle (n=N)	
			Nicht-ulzerativ	Ulzerativ		
Central (16)	Sotouboua (15)	Abuda Bamonda	0	1	1	
		Adjengie	0	1	1	
		Affisalo Copé	0	1	1	
		Babade	0	1	1	
		Djiguina Abandi	0	1	1	
		Edjare Copé	0	1	1	
		Jereboua Kedjan	0	1	1	
		Kévé	0	1	1	
		Mono	0	1	1	
		Somida	1	0	1	
		Sotouboua	0	4	4	
		Toukoudjou	1	0	1	
		Tchaoudjo (1)	Kapangalam	0	1	1
		Maritime (184)	Golfe (5)	Agbalejedo	0	1
Agoé	0			1	1	
Lomé	0			3	3	
Lacs (6)	Afanyan		0	1	1	
	Agbétiko		0	1	1	
	Aného		0	1	1	
	Kodohsé		0	1	1	
	Massedia		0	1	1	
	Zaliré		0	1	1	
Lomé (2)	Adidogomé		0	1	1	
	Nyikonakpoe		0	1	1	
Vo (15)	Afowime		0	1	2	
	Akosewa Sevagan		0	1	1	
	Amengnran		0	1	1	
	Afoin		0	1	1	
	Dagbati		0	1	1	
	Fongbé Apédome		0	1	2	
	Hahotoe		0	1	1	

Herkunftsregion	Herkunftsdestrikt	Herkunftsort	Anzahl der BUD-Verdachtsfälle aufgeteilt nach Läsionsart (n=N)		Anzahl der BUD-Verdachtsfälle (n=N)
			Nicht-ulzerativ	Ulzerativ	
		Kovié	0	1	1
		Momé Hounkpati	0	1	1
		Sofé	0	1	1
		Vogan	0	3	3
	Yoto (69)	Agbekou	0	1	1
		Ahépé	0	1	1
		Avegode	0	1	1
		Essé Ana	0	2	2
		Gbatepé	0	1	1
		Gbeto	0	1	1
		Gbots Klopeme	0	1	1
		Kara	0	1	1
		Messegan	0	1	1
		Sedome	0	1	1
		Tabligbo	0	3	3
		Tchékpo	0	1	1
		Tchékpo Anagali	6	4	10
		Tchékpo Avedji	0	1	1
		Tchékpo Dédékpóé	5	9	14
		Tchékpo Dévé	14	14	28
		Tchékpo Djigbe	0	1	1
	Zio (87)	Adangbé	0	6	6
		Agbalaho	0	1	1
		Agbelouhoin	0	1	1
		Agbelowé	1	0	1
		Agoloyer	0	1	1
		Ahavé	0	1	1
		Ahépé	0	1	1
		Aképé	0	1	1
		Alokoegbé	1	0	1
		Amakpapé	0	1	1
		Anagali	1	0	1

Anhang

Herkunftsregion	Herkunftsdestrikt	Herkunftsort	Anzahl der BUD-Verdachtsfälle aufgeteilt nach Läsionsart (n=N)		Anzahl der BUD-Verdachtsfälle (n=N)
			Nicht-ulzerativ	Ulzerativ	
		Assadamè	0	1	1
		Ave	0	1	1
		Bani Copé	1	1	2
		Bolou	1	0	1
		Davié	0	2	2
		Daweli	0	1	1
		Dékpo Bonoudekpo	1	0	1
		Dotcha Kopé	1	0	1
		Dowedi	0	1	1
		Essé	0	1	1
		Essé Ana	0	1	1
		Essé Nadje	0	1	1
		Ewli	0	2	2
		Ezo	1	3	4
		Fongbé	0	1	1
		Fongbé Botsi	1	1	2
		Fongbé Zogbedji	0	1	1
		Gamé	1	1	2
		Gamé Aké	0	1	1
		Gapé Agocopé	4	1	5
		Gapé Akpakpedomé	0	1	1
		Gapé Frangadua	0	1	1
		Gapé Kpodji	1	4	5
		Gati	0	2	2
		Gati Agodjou	1	1	2
		Gati Sun	3	3	6
		Gatigble	0	1	1
		Hokoegbe	0	1	1
		Kagni Copé	1	0	1
		Klokpoé	1	0	1
		Kovié	1	3	4

Herkunftsregion	Herkunftsdestrikt	Herkunftsort	Anzahl der BUD-Verdachtsfälle aufgeteilt nach Läsionsart (n=N)		Anzahl der BUD-Verdachtsfälle (n=N)
			Nicht-ulzerativ	Ulzerativ	
		Kpome Agome	0	1	1
		Labiknove	0	1	1
		Mission	0	1	1
		Tovegan	1	1	2
		Tsevié	0	4	4
		Wonougba	0	1	1
		Yobo	0	1	1
		Yobo Sedjro	1	1	2
		Zogbedji	0	1	1
Plateaux (2)	Ogou (1)	Atakpamé	0	1	1
	Kloto (1)	Womé Aglamato	0	1	1
Alle			51	151	202

Tab. 26: Anzahl und Herkunft der BUD-Verdachtsfälle



Abb. 16: Specimen-set OP



Abb. 17: BUD-case-finding



Abb. 18: Diagnostik- und Probenabnahmeschulung



Abb. 19: Probenabnahmeschulung

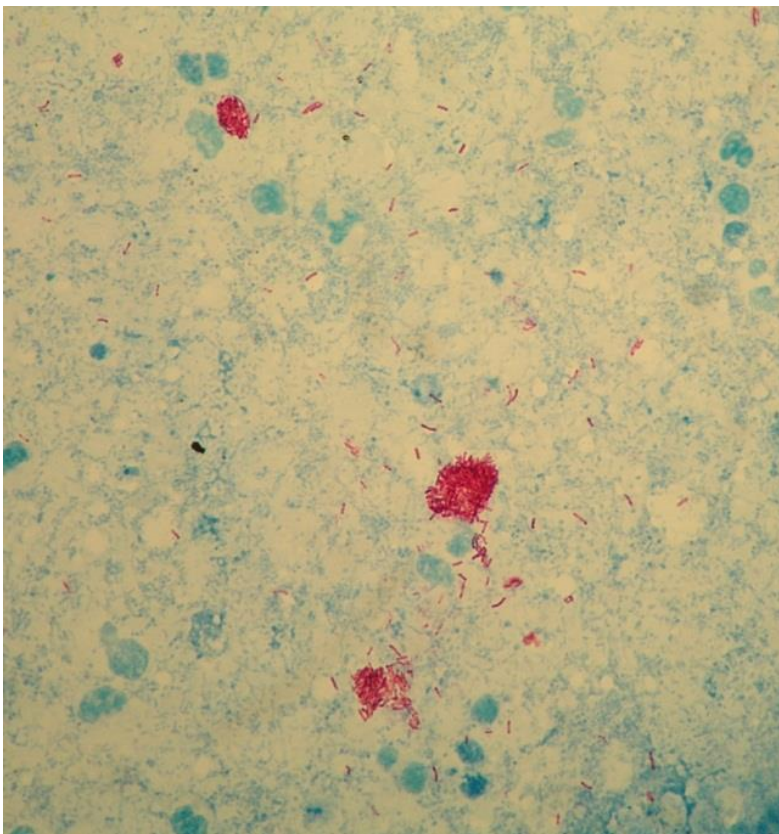


Abb. 20: Mikroskopisches Präparat nach Ziehl-Neelsen Färbung

11.2 Anleitung zur Färbung nach Ziehl-Neelsen

Fixierung der Mykobakterien	nativer OT kurz über offene Flamme (Bunsenbrenner).
Färbung	OT komplett mit Karbolfuchsinlösung bedecken, durch Unterhitze erhitzen (nicht kochen), 5 min Einwirkzeit, Abgießen der Färlösung.
Entfärbung	OT mit 20% Schwefelsäure bedecken (3 min.), mit Wasser abspülen.
Gegenfärbung	OT mit Methyleneblau bedecken (1 min.), mit Wasser abspülen, Trocknung bei RT

Tab. 27: AFB-Färbung nach Ziehl-Neelsen

(Quelle: APHL, CDC, IUATLD, KNCV, RIT & WHO (2002) External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy. APHL, Washington, DC.).

11.3 Anleitung zur Nukleinsäurepräparation aus klinischen Patientenproben

Mykobakterieninaktivierung	20 min. Inkubation der Proben bei 95°C, dann Abkühlung auf RT [89]
Zellyse	Zugabe von 15µl Proteinase K je Probe, darauf Inkubation bei 55°C und 35%iger Schüttelgeschwindigkeit üN; darauf Inaktivierung der Proteinase K mittels Inkubation bei 80°C (20 min.) und anschließender Abkühlung auf RT; darauf Zugabe von je 15µl Lysozym und Inkubation bei 37°C für 60 min. (Bei Wundabstrichen und FNA's wurde die Lysozymbehandlung der Proteinase K Lyse vorgezogen.) [89]
Protein Präzipitation	Zunächst Lagerung der Proben auf Eis für 5 min., dann Zugabe von 230µl PPS je Probe, erneute Eisinkubation (5 min.) der Proben, abschließend Zentrifugieren (5 min.) bei 13.000 rpm [89].
DNA Präzipitation	Überführung des Überstands in neue Reagenzgefäße sowie Zugabe von 700 µl Isopropanol und 2µl Glykogen, dann Zentrifugieren bei 13.000 rpm für 5 min.; nach Verwerfen des Überstands erfolgt Zugabe von 700µl Ethanol mit anschließendem Zentrifugieren bei 13.000 rpm für 5 min.; erneutes Verwerfen des Überstands, Pellets in offenen Reaktionsgefäßen bei RT lufttrocknen lassen [89].
DNA Hydratation	Nach Zugabe von je 200µl DNA Hydratation Solution bei 55°C (15min.) bei Schüttelfrequenz von 35% bis zur vollständigen Auflösung der Pellets inkubieren [89].

Tab. 28: Nukleinsäurenpräparation aus diagnostischem Patientenmaterial