

Masterproef ingediend tot het bekomen van de graad van Master
in de Biologie, afstudeerrichting Cel- & Systeembioologie, optie
onderzoek

Onderwijsinstelling Universiteit Antwerpen

Faculteit Wetenschappen

Titel: **Amoeben als gastheren voor mycobacteriën in water,
biofilms en detritus in relatie tot Buruli ulcus endemiciteit**

Auteur: Sophie Gryseels

Promotor: Prof. dr. Françoise Portaels

Copromotor: Prof. dr. Herwig Leirs

Begeleider: Miriam Eddyani

Amoeben als gastheren voor mycobacteriën in water, biofilms en detritus in relatie tot *Buruli ulcus* endemiciteit

Auteur: Sophie Gryseels

Promotor: Prof. dr. Françoise Portaels

Co-promotor: Prof. dr. Herwig Leirs

Begeleider: Miriam Eddyani

8 juni 2009

Inhoudstafel

Samenvatting	4
Abstract.....	5
I. Inleiding.....	6
1. Mycobacterium	6
1.1 Mycobacteriën zijn robuust en vaak opportunistische pathogenen.....	6
1.2 Mycobacterium ulcerans	7
1.2.1 De ziekte Buruli ulcus	7
1.2.2 Epidemiologie	8
1.2.3 <i>M. ulcerans</i> in de natuur	9
1.2.4 Transmissie.....	10
1.2.5 Moleculaire biologie en evolutie van <i>M. ulcerans</i>	12
1.2.6 Detectieproblemen: lage aantallen en nauw verwante soorten.....	13
2. Bacteriën intracellulair in protozoa.....	15
2.1 Ontwijken van predatie en bescherming.....	15
2.2 Protozoa als reservoir.....	16
2.2.1 Protozoa als Trojaanse paarden	17
2.2.2 Protozoa als evolutionaire kribbes	18
2.2.3 Intracellulair leven in protozoa als oefening voor virulentie	19
2.3 Amoeben en Mycobacterium ulcerans	20

2.3.1 <i>M. ulcerans</i> intracellulair in de mens?	20
2.3.2 Rol van amoeben in verspreiding en virulentie van <i>M. ulcerans</i> ?	20
3. Hypothesen	21
II. Materialen en methoden	23
1. Staalname.....	23
2. Verwerking en oplossing van de stalen	25
3. Amoebenkweek	25
4. Mycobacteriënkweek	26
5. DNA extractie.....	26
6. 16S rRNA nested PCR en gel-elektroforese	27
7. TaqMan® real-time PCR.....	28
8. Statistische tests.....	29
III. Resultaten	32
1. Fysisch-chemische parameters.....	32
1.1 Zuurstof	32
1.2 pH	32
1.3 Temperatuur.....	32
2. Distributie van amoeben.....	35
3. Distributie van mycobacteriën.....	36
3.1 Verschillende testen vullen elkaar aan.....	36
3.2 Bepalende factoren voor het voorkomen van mycobacteriën	37
3.3 Vergelijking verspreidingspatroon mycobacteriën en amoeben.....	38
3.4 Detectie van <i>M. ulcerans</i>	38
3.5 Mycobacteriën intracellulair in micro-organismen	41
3.6 Mycobacteriële diversiteit	44
4. Mycobacteriën geassocieerd met amoebenculturen	46
4.1 Detectie van het mycobacteriëel 16S gen	46
4.2 Detectie van IS2404	47
4.3 Distributie mycobacterie-positieve geïsoleerde amoeben.....	49
IV. Discussie	50
1. Ecologie van mycobacteriën in aquatische ecosystemen in Ghana	50
1.1 Mycobacteriën komen wijdverspreid voor	50
1.2 Diversiteit mycobacteriën: soortidentificatie van gekweekte stammen	51
1.3 Mycobacteriën kennen naast een vrijlevende ook een intracellulaire levenswijze.....	51
1.4 Detectie van IS2404, IS2606 en KR	53

1.5 Bespreking van de gebruikte methodes voor de detectie en identificatie van alle leden van <i>Mycobacterium</i>	54
2. Detectie en identificatie van alle leden van <i>Mycobacterium</i>	56
2.1 Amoeben komen wijdverspreid voor in aquatische ecosystemen van Ghana.....	56
2.2 Mycobacteriën geassocieerd met amoebenculturen.....	57
2.3 Detectie van IS2404 in amoebenculturen	58
2.4 Bespreking van de gebruikte methodes.....	59
3. <i>M. ulcerans</i> , amoeben en zijn andere potentiële gastheren: een relatie met BU endemiciteit?.....	61
4. Conclusie	63
V. Dankwoord	
VI. Referenties	
VII. Bijlagen	

Samenvatting

Mycobacterium ulcerans veroorzaakt de necrotiserende huidziekte Buruli ulcus (BU). Hoe mensen besmet raken is nog onbekend, maar de nabijheid van traag stromend water is een bekende risicofactor en *M. ulcerans* is dan ook gedetecteerd in verscheidene elementen van aquatisch systemen, voornamelijk in/aan bijtende wantsen en muggen. Alle leden van het genus *Mycobacterium* zijn resistent tegen de vertering door amoeben *in vitro* en een intracellulair verblijf kan zelfs hun virulentie verhogen. Deze studie beoogt een intracellulaire levenswijze van mycobacteriën aan te tonen in Ghanese waterlichamen, met als uiteindelijk doel de hypothesen te toetsen dat amoeben gastheren zijn voor *M. ulcerans* en van belang zijn in de transmissie.

We bezochten 5 hoog BU endemische en 2 laag BU endemische dorpen rond Agogo, Ghana, waar we water-, biofilm- en detritusstalen namen in waterlichamen die de lokale bevolking frequent gebruikte. We testten de aanwezigheid van mycobacteriën met 16S rRNA-PCR en specifiek die van *M. ulcerans* met IS2404/IPC en IS2606/KR multiplex real-time PCR testen. Voorts kweekten we zowel extra- als intracellulaire mycobacteriën. We isoleerden amoeben en testten of mycobacteriën ermee geassocieerd waren. IS2404 werd gedetecteerd in 3 stalen (2%) en in 1 daarvan ook IS2606 en KR, maar wegens de lage concentraties kunnen we niet concluderen of het al dan niet om *M. ulcerans* gaat. IS2404 bevattende mycobacteriën werden echter vaker gedetecteerd in amoebenculturen (5,2%), een indicatie dat ze groeiden op de agar platen. IS2404 werd zowel in hoog als laag BU endemische gebieden gedetecteerd. We concluderen dat amoeben waarschijnlijk niet van belang zijn in de transmissie van *M. ulcerans*, maar vormen wel een hoopvol mechanisme om deze gemakkelijker te detecteren in de omgeving.

Andere mycobacteriën waren aanwezig in 93,2 % van de stalen en amoeben isoleerden we uit 91,2% van de stalen, maar deze twee verspreidingen waren niet met elkaar gecorreleerd. In detritus waren mycobacteriën vaker intracellulair dan in andere habitats. 18,5 % van de amoebenculturen waren positief voor mycobacterieel 16S rRNA DNA. We concluderen dat mycobacteriën in Ghanese waterlichamen zowel een extracellulaire als een intracellulaire levenswijze kennen, maar dit is niet gerelateerd aan BU endemiciteit.

Abstract

Mycobacterium ulcerans causes the necrotizing skin disease Buruli ulcer (BU). How people get infected is still unknown, but the proximity of stagnant to slow flowing water is a well-known risk factor and *M. ulcerans* has been detected in many elements of aquatic ecosystems, mainly in semi-aquatic biting bugs and mosquito's. All members of the genus *Mycobacterium* are resistant to the digestion of amoebae and an intracellular stay can even enhance their virulence. This study aims to reveal an intracellular life-style of mycobacteria in Ghanaian waterbodies, with the eventual goal of testing the hypotheses that amoeba are natural hosts for *M. ulcerans* and are important for its transmission to humans.

We visited 5 highly BU endemic villages and 2 low BU endemic villages around Agogo, Ghana, where we collected water, biofilm and detritus samples in waterbodies that are regularly frequented by the local inhabitants. We verified the presence of mycobacteria by 16S rRNA-PCR and moreover of *M. ulcerans* with IS2404/IPC and IS2606/KR multiplex real-time PCR assays. We cultivated extracellular as well as intracellular mycobacteria. We isolated amoeba and analysed whether mycobacteria were associated with the amoebacultures.

IS2404 was detected in 3 samples (2%) of which in one IS2606 and KR were also detected, but because of the low DNA concentrations we cannot confirm nor deny the presence of *M. ulcerans* in these 3 samples. IS2404 containing bacteria were detected more often associated with amoebacultures (5.2%), an indication that they were multiplying on the agar plates. IS2404 was detected both in high and low BU endemic areas, however. We conclude that amoeba are probably not of importance in *M. ulcerans* transmission, but are perhaps a promising tool for its detection in the environment.

Other mycobacteria were present in 93.2% of the samples and we isolated amoeba from 91.2% of the samples. However, these two distributions were not correlated.

Mycobacteria were more often found to be intracellular in detritus than in biofilm samples. 18.5% of amoebacultures contained associated mycobacteria. We conclude that mycobacteria have both an extracellular as an intracellular life-style in Ghanaian waterbodies, but this is not related to BU endemicity.

I. Inleiding

Uit *in vitro* experimenten is het duidelijk dat protozoa potentiële gastheren zijn voor verscheidene bacteriesoorten waaronder *Mycobacterium sp.*, maar de aard van hun relatie in natuurlijke omstandigheden is zelden onderzocht. Dit is net waar deze studie om draait. Hier onderzoeken we of mycobacteriën in natuurlijke waterlichamen in Ghana geassocieerd zijn met amoeben, en bovendien of deze amoeben natuurlijke gastheren zijn voor *Mycobacterium ulcerans*, die de destructieve huidziekte Buruli ulcer bij mensen en enkele andere zoogdieren veroorzaakt.

1. *Mycobacterium*

1. 1. Mycobacteriën zijn robuust en vaak opportunistische pathogenen

De leden van het genus *Mycobacterium* zijn gram positieve, aerobe bacteriën die behoren tot de Actinobacteria. De naam “myco” betekent “was” in het Latijn, en refereert naar hun wasachtige, hydrofobe celwand die rijk is aan mycolische zuren (lange-keten lipiden). Het is vooral door de eigenschappen van deze celwand dat mycobacteriën karakteristiek beter bestand zijn tegen allerlei zuren (bv. oxaalzuur), basen (bv. NaOH) en detergents. Ze behouden de paarse kleur van carbolfuchsiene na spoelen met zure alcohol waardoor ze specifiek gekleurd kunnen worden, en blijven in leven na verscheidene decontaminatieprocedures waardoor ze selectief geïsoleerd kunnen worden uit een mengeling van organismen. Deze robuustheid brengt echter ook trade-offs met zich mee: de synthese van lange-keten lipiden vraagt een hoge energetische kost en hun quasi impermeabele hydrofobe oppervlakte bemoeilijkt de opname van hydrofiele nutriënten, waardoor mycobacteriën relatief traag vermenigvuldigen (Brennan en Nikaido, 1995). Ze worden echter nog opgedeeld in een “traag groeiende” groep, die 1 tot meerdere weken nodig heeft om te groeien, en een “snel groeiende” groep, die 3-5 dagen nodig heeft om kolonies te vormen. Dit wordt voornamelijk veroorzaakt door de aanwezigheid van respectievelijk 1 of 2 kopieën van rRNA genclusters (Stahl en Urbance, 1990; Bercovier et al., 1986), maar ook blijkt de aanwezigheid van extra types van porines in de celwand (waardoor hydrofiele nutriënten vloeien) te bepalen of een soort snel- of traag-groeiend is (Niederweiss et al., 1999).

Mycobacteria komen wijdverspreid voor en kunnen naargelang de soort gedetecteerd en geïsoleerd worden uit een waaier van niches zoals water, aarde en detritus in zoet-, zout- en brakwaterige milieus en afvalwater- en drinkwatersystemen (Falkinham en Portaels,

2004). Ze kunnen ook voorkomen als parasieten of symbionten in verscheidene protozoa, invertebraten en vertebraten, inclusief de mens. Behalve *M. tuberculosis* en *M. leprae* (veroorzakers van respectievelijk tuberculose en lepra) zijn de meeste van de tot nu toe beschreven mycobacteriën niet obligaat parasitair, maar veeleer omgevingsbacteriën die opportunistisch pathogeen voor mens en andere dieren kunnen zijn. Ze worden vaak aangeduid met de term “niet-tuberculeuze mycobacteriën” (NTM) of “atypische mycobacteriën” en kunnen bijvoorbeeld lymphadenitis en verscheidene infecties aan de longen, huid, pezen, gewrichten en botten veroorzaken na trauma (Falkinham, 1996). Alleen bij *M. tuberculosis* en *M. leprae* vindt transmissie tussen mensen onderling plaats; bij de opportunistische omgevingsmycobacteriën ligt de bron van infectie steeds in de omgeving; er zijn nooit meldingen van mens-tot-mens transmissie (Falkinham, 2002). Steeds meer nieuwe mycobacteriesoorten worden ontdekt die geassocieerd zijn met een infectie die mensen opgelopen hebben vanuit de omgeving (Falkinham, 2002; Tortoli, 2006). Dit komt o.a. door de ontwikkeling van betere identificatietechnieken, en door de verhoogde kans die Aidspatiënten hebben op mycobacteriële infecties (Horsburgh, 1996). We kunnen echter veronderstellen dat er ook een hele reeks niet-pathogene omgevingsmycobacteriën bestaan die nog niet beschreven zijn vermits vanuit de grootste bron van mycobacteriestammen afkomstig is van geïnfecteerde mensen (Tortoli, 2006).

1. 2. *Mycobacterium ulcerans*

1. 2. 1. De ziekte Buruli ulcus

M. ulcerans is één van deze pathogene mycobacteriën die de mens infecteert vanuit de natuurlijke omgeving. Mens-tot-mens transmissie is zeer zeldzaam of onbestaand (Debacker et al, 2003). De necrotiserende huidziekte die het veroorzaakt, Buruli ulcus (BU), is genaamd naar de Buruli regio in Uganda waar in de jaren '60 een grote BU uitbraak was in vluchtelingenkampen. Na *M. tuberculosis* en *M. leprae* is *M. ulcerans* de belangrijkste mycobacteriële infectie bij mensen, en in sommige West-Afrikaanse landen komt er meer BU voor dan tuberculose en lepra (Debacker et al., 2004). De ziekte begint als een pijnloze, beweegbare zwelling in de huid (nodule) die zonder behandeling (combinatie van rifampicin en streptomycin/amikacin) zal opengaan tot zweren met typische loshangende randen. Veel patiënten in Afrika zullen in dit stadium geen behandeling ondergaan door de relatief hoge kost, de soms moeilijke bereikbaarheid van medische zorg, te vertrouwen op weinig effectieve traditionele medicijnen, door angst voor operatie en door het stigma dat deze mysterieuze ziekte met zich meebrengt (Mulder et al., 2008). Hierdoor kan de zweer uitbreiden en zo grote delen van het

lichaam beslaan (Figuur 1). Uiteindelijk kan ook het bot aangetast worden waardoor misvorming kan optreden (Portaels et al., 2009).

Af en toe helen de wonden vanzelf, maar meestal moet de hele betrokken huidlaag geopereerd worden. In beide gevallen leidt de littekenvorming in een kwart van de patiënten tot een permanente handicap (WHO, 2008).



Figuur 1. Verschillende stadia (van links naar rechts: nodule, kleine zweer en grote zweer) van BU en het litteken en de handicap die gevormd worden na operatie (rechtse foto). Foto's: dr. K. Asiedu (WHO, 2008).

1. 2. 2. Epidemiologie

Veruit de meeste BU-patiënten leven in arme gebieden in tropisch West- en Centraal-Afrika, en door sociale stigmatisering, beperkte gezondheidszorg en gebrekkige sociale voorzieningen heeft de ziekte ook de grootste impact op de levens van deze mensen. Er zijn enkele gevallen bekend uit Midden- en Zuid-Amerika, Japan, China en Zuid-Oost-Azië (WHO, 2008; Janssens et al., 2005; Portaels et al., 2009), maar verrassend genoeg komt de ziekte redelijk frequent voor in subtropisch Zuid-Oost Australië, naast enkele gevallen in Noord-Oost Australië. Binnenin de grote endemische regio's blijkt de ziekte in geïsoleerde foci ter grootte van een dorp of gemeenschap voor te komen (Portaels et al., 2009). De reden van het bizarre ruimtelijk patroon van de ziekte is nog niet achterhaald, noch is het habitat van *M. ulcerans* in de natuur geïdentificeerd of de exacte wijze waarop mensen besmet geraken.

Verscheidene epidemiologische studies associëren BU endemiciteit met zoetwater ecosystemen. De nabijheid van waterbassins, kleine dammen en geïrrigeerde rijstvelden (Wagner et al., 2008; Brou et al., 2008), het gebruik van water uit de omgeving (rivieren, moerassen, vijvers enz.) in plaats van gepompt grondwater (Debacker et al., 2006; Johnson et al., 2005 EID), het voorkomen van overstromingen (Merrit et al., 2005) en het waden en zwemmen in rivieren en moerassen (Aiga et al., 2004; Raghunathan et al., 2005; Pouillot et al., 2007) zouden risicofactoren zijn voor BU. Een uitbraak op een eiland in Zuid-Australië bijvoorbeeld was waarschijnlijk te wijten aan irrigatiewerken aan een

golfterrein (Veitch et al., 1997; Ross et al., 1997). In de vele studies die op zoek gingen naar de natuurlijke bron van *M. ulcerans* infectie werd zijn DNA dan ook gedetecteerd in water (Ross et al., 1997; Roberts et al., 1997; Stinear et al., 2000a; Williamson et al., 2008) en andere elementen van het aquatisch ecosysteem zoals biofilms, detritus, slakken, insecten en vissen (Marsollier et al., 2002, 2004a en 2004b; Williamson, 2008; Stinear et al., 2000a; Kotlowski et al., 2004; Portaels et al., 1999; Fyfe et al., 2007; Johnson et al., 2007; Eddyani et al., 2004). Men kon echter telkens concluderen dat *M. ulcerans* slechts in lage concentraties aanwezig was. *M. ulcerans* is namelijk slechts zelden gekweekt vanuit de omgeving, de detectiefrequentie d.m.v. PCR is redelijk laag en positieve resultaten zijn vaak niet herhaalbaar (Stinear et al., 2000a). De aanwezigheid van een aquatisch systeem kan trouwens de verspreiding van *M. ulcerans* in mensen niet volledig verklaren; er zijn namelijk meerdere tropische gebieden in Afrika in te beelden met gelijkaardige aquatische systemen en waar *M. ulcerans* infectie niet voorkomt. Ook het voorkomen van de ziekte in Zuid-Oost Australië, met een mediterraan klimaat, en niet in Noord-Australië, dat wel een gelijkaardig klimaat en regenpatroon heeft als BU endemisch West-Afrika, geeft aan dat de oorzaak van de verspreidingspatronen van de ziekte veel complexer is dan verklaard kan worden aan de hand van risicofactoren als 'nabijheid van water'.

1.2.3. *M. ulcerans* in de natuur

Om de transmissieroute van *M. ulcerans* te kunnen achterhalen moet het habitat en het reservoir van de bacterie in de natuur bekend zijn. Zoals hiervoor vermeld is het DNA van *M. ulcerans* inderdaad reeds aangetroffen in een waaier van abiotische en biotische niches in aquatische ecosystemen, zij het in lage aantallen. De detectie van *M. ulcerans* in water (Ross et al., 1997b; Roberts, 1997; Stinear et al., 2000a; Williamson et al., 2008), in biofilms op aquatische planten (Marsollier et al., 2004b) en op glazen oppervlakten (Williamson et al., 2008), in detritus, aarde en sedimenten (Stinear et al., 2000a, Fyfe et al., 2007) zou kunnen betekenen dat het vrijlevend kan voorkomen, al wordt echter gepostuleerd dat *M. ulcerans* te fragiel hiervoor zou zijn (Portaels et al., 2001). Misschien leefde *M. ulcerans* in deze stalen eerder intracellulair in micro-organismen zoals protozoa.

M. ulcerans is tevens gedetecteerd in aquatische dieren, namelijk filtervoedende slakken (Marsollier et al., 2004a; Kotlowski et al., 2004), verzamelende, schrapende en prederende insecten (Williamson et al., 2008) en microfage vissen (Kotlowski et al., 2004; Eddyani et al., 2004). Geen van deze dieren vertoonden echter BU-achtige wonden (Portaels et al., 2001). In Australië zijn wel heel wat zoogdieren beschreven met BU:

koala's, buidelratten, een alpaca, een kangoeroerat, twee paarden, een kat, een hond en een rat (Mitchell et al., 1984; Portaels et al., 2001; van der Werf et al., 2005; Elsner et al., 2008; Fyfe et al., 2009; WHO BU congress). In Afrika is echter buiten de mens nog geen enkel zoogdier beschreven met BU. Het zou echter niet verwonderlijk zijn als in de toekomst ook in Afrika wilde of gedomesticeerde dieren worden ontdekt die drager zijn van *M. ulcerans*, gezien het relatieve gemak waarmee de bacterie zich weet te vermenigvuldigen in muizen en andere zoogdieren, en het gemeenschappelijke gebruik van natuurlijke waterbronnen door zowel gedomesticeerde en wilde dieren als door mensen in landelijke Afrikaanse gebieden.

1.2.4. Transmissie

Sinds de studie van Portaels et al. (1999), waar *M. ulcerans* voor het eerst werd aangetroffen in wantsen uit Benin, werd de rol van prederende insecten in de transmissie uitgebreid onderzocht. Hun hypothese was dat prederende insecten van de Belostomidae en Naucoridae (suborde Heteroptera: de wantsen) *M. ulcerans* overbrengen op mensen door beten of door besmetting van wonden met hun faeces (Portaels et al., 1999). De insecten zouden zelf besmet worden door hun voedsel, bijvoorbeeld bacterievore insectenlarven.

Deze hypothese leek bevestigd door enkele experimenten van Marsollier et al. (2002, 2005, 2007a en 2007b) en Mosi et al. (2008). Uitgehongerde insectenlarven gevoed met *M. ulcerans* werden op hun beurt gevoed aan *Naucoris cimicoides* (weliswaar een Europese soort), waar *M. ulcerans* succesvol de speekselklieren bereikte, voornamelijk hier vertoefde en zelfs enigszins repliceerde (Marsollier et al., 2002). Andere mycobacteriën (*M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* en *M. marinum*) konden zich niet handhaven in *N. cimicoides* (Marsollier et al., 2002). Marsollier et al. (2002) lieten de *M. ulcerans* geïnfecteerde *N. cimicoides* bijten in muizenstaarten, wat in 70% van de muizen resulteerde in BU-achtige wonden veroorzaakt door de overgebrachte *M. ulcerans*. In verdere experimenten werd duidelijk dat *M. ulcerans* zich organiseert in kleine biofilms aan de styletten van de monddelen van *N. cimicoides*, vervolgens in een holte van de kop het coeloom binnendringt om dan opgenomen te worden door plasmocyten die de bacteriën vervoeren naar de speekselklieren (Marsollier et al., 2005, 2007b). Ook in het onderzoek van Mosi et al. (2008), waar wel wantsensoorten uit BU endemisch gebieden gebruikt werden (*Appasus* sp.), bleek *M. ulcerans* zich te handhaven in de speekselklieren na voeding met geïnfecteerde muggenlarven, hoewel ze hier niet repliceerden. In dit onderzoek groeide *M. ulcerans* wel op het exoskelet van de monddelen. Deze studies en experimenten geven mooi aan dat bijtende wantsen als

vector kunnen dienen voor *M. ulcerans*. Het gebruik van verschillende wantsengenera in de twee studies duidt aan dat het vermogen van *M. ulcerans* om via voedsel de speekselklieren te bereiken waarschijnlijk universeel toepasbaar is bij wantsen. Mogelijk betekent dit dat *M. ulcerans* geen specifieke soort gebruikt als vector.

In een recente studie van Portaels et al. in Benin (in voorbereiding) waren significant meer aquatische insecten positief voor *M. ulcerans* DNA in hoog endemische gemeenschappen in vergelijking met middelmatig en laag endemische gebieden, hoewel er geen verschil was tussen de middelmatige en laag endemische gebieden. Bovendien daalde in de hoog endemische gemeenschap het aantal BU patiënten in twee jaar tijd, in correlatie met het aantal *M. ulcerans* positieve wantsen in dat gebied (Portaels et al., in voorbereiding). In een andere grootschalige veldstudie verschilde het aantal *M. ulcerans* positieve wantsen en andere invertebraten echter niet tussen gemeenschappen endemisch voor BU en niet-endemische gemeenschappen (Williamson et al., 2008).

Benbow et al. (2008) suggereerden dat de kans dat de hoofdroute van transmissie daadwerkelijk via bijtende wantsvectoren verloopt eerder klein is. Wantsen die mensen bijten zijn namelijk vrij zeldzaam in BU endemische gebieden; in een grootschalige veldstudie in Ghana maakten ze maar 0,2% uit van alle invertebraten (Williamson et al., 2008). Belangrijker is dat er geen correlatie was tussen de abundantie van deze potentiële vectoren en het voorkomen van *M. ulcerans* infectie (Benbow et al., 2008) en er maar weinig meldingen zijn van BU patiënten die zich herinneren gebeten te zijn door insecten in het water (een betrouwbare stelling aangezien zo'n beet vrij pijnlijk zou zijn) (Benbow et al., 2008).

Anderzijds is de tussenkomst van een vector misschien niet nodig om met *M. ulcerans* geïnfecteerd te worden. Een *M. ulcerans* zweer zou zich namelijk vaak ontwikkelen op de plek van een oude wonde (gaande van hypodermische injecties tot schotwonden), wat leidde tot de hypothese dat via deze wonden *M. ulcerans* vanuit het water rechtstreeks onderhuidse lagen weet te koloniseren (Meyers et al., 1974).

Daarenboven mogen de vele andere diersoorten niet vergeten worden waarin *M. ulcerans* is gedetecteerd maar waar nog geen infectie experimenten zijn op uitgevoerd of waar nog niet uitvoerig stalen van zijn genomen in BU endemische gebieden. Het is niet uitgesloten dat zulke studies een gelijkaardige rol als vector voor andere dieren zouden kunnen blootleggen. Zo is bijvoorbeeld recent in Australië ontdekt dat een relatief groot aantal muggen *M. ulcerans* draagt, bovendien dezelfde stam als diegene die mensen infecteerden in hetzelfde gebied (Johnson et al., 2007). Daarenboven zouden

muggenbeten een risicofactor zijn voor het vergaren van de ziekte (Quek et al., 2007); ook in Kameroen bleek het gebruik van muggennetten een beschermende factor te zijn tegen BU (Pouillot et al., 2007). Ten slotte correleerde de BU incidentie van de voorbije jaren met de incidentie van andere ziektes die worden overgedragen door muggen (Ross River Virus en Barmah Forest Virus) (Johnson en Lavender, 2009).

Het is duidelijk dat het onderzoek naar de rol van (insecten)vectoren in de transmissie nogal dubbelzinnig is, waardoor er nog veel onderzoek nodig is om de eventuele rol van vectoren in de transmissie van *M. ulcerans* op te kunnen helderen.

1.2.5. Moleculaire biologie en evolutie van *M. ulcerans*

In 1997 werd de eerste PCR test ontwikkeld voor de detectie van *M. ulcerans*. Deze test amplificeert IS2404, een insertiesequentie (i.e. een kleine transposon) die aanwezig is in ongeveer 200 kopieën en 5,8% van het DNA uitmaakt (Ross et al., 1997a; Stinear et al., 2007). Hierdoor is de PCR test relatief gevoelig, en werd het voor het eerst mogelijk om *M. ulcerans* in de omgeving te detecteren (Ross et al., 1997b).

Doorheen de jaren zijn andere *M. ulcerans* sequenties opgespoord zoals IS2606 (aanwezig in 90 tot 98 kopieën [Stinear et al., 2007]), verscheidene VNTR's (variable-number-tandem-repeats) (bv. Ablordey et al., 2005; Hilty et al., 2006; Stragier et al., 2006) en een volledig plasmide, pMUM. Dit plasmide is verantwoordelijk voor de specifieke virulentie van *M. ulcerans*: hier liggen de genen (*mlsA1*, *mlsA2* en *mlsB*) die coderen voor de enzymen die instaan voor de synthese en modificatie van mycolactone (Stinear et al., 2004). Mycolactone is een polyketide toxine en tot nu toe de enige bekende virulentiefactor van *M. ulcerans*. Wanneer dit lipide in muizen wordt geïnoculeerd, ontwikkelt hetzelfde ziektebeeld als wanneer levende bacteriën worden geïnoculeerd (George et al., 2000). Er zijn verschillende types van mycolactone: *M. ulcerans* stammen uit Afrika, Maleisië en Japan produceren mycolactone A/B, uit Australië mycolactone C en die uit China produceren mycolactone D (Mve-Obiang et al., 2003; Judd et al., 2004).

Door multi-locus sequentievergelijkingen kon worden aangetoond dat *M. ulcerans* recent is afgesplitst van een voorganger van *M. marinum* (Stinear et al., 2000b). *M. marinum* is een gekend opportunistisch omgevingspathogeen dat tuberculose-achtige infecties veroorzaakt bij vissen, kikkers en soms ook bij de mens (Falkinham, 1996).

De evolutie van deze *M. marinum* voorvader naar *M. ulcerans* wordt voornamelijk gekenmerkt door heel wat deleties (een vermindering van 1064 kb) maar ook redelijk wat duplicaties veroorzaakt door de transposase-activiteit van IS2404 en IS2606 (Stinear et

al., 2007). Bovendien verwierf *M. ulcerans* het virulentieplasmide pMUM (Stinear et al., 2005). Genoomreductie, proliferatie van insertiesequenties, accumulatie van pseudogenen en de verwerving van uitheemse genen (bijvoorbeeld plasmiden) zou kenmerkend zijn voor bacteriën die recent door een evolutionaire flessenhals zijn gepasseerd en die zich aangepast hebben aan een meer stabiele omgeving (Stinear et al., 2007; Casadevall, 2008). *M. marinum* maakt na lichtinductie carotenoïde pigmenten aan, maar bij *M. ulcerans* is één van de genen (CRTI) die hier verantwoordelijk voor zijn niet meer functioneel (Stinear et al., 2007). Daardoor zou *M. ulcerans* misschien gevoeliger voor licht kunnen zijn (Stinear et al., 2007), wat opnieuw aangeeft dat *M. ulcerans* in een meer beschermde niche in het milieu voorkomt dan *M. marinum* (Demangel et al., 2009). Het zou anderzijds ook kunnen verklaren waarom *M. ulcerans* in zo'n lage concentraties te vinden is in de omgeving.

De vraag blijft uiteraard welke deze nieuwe, donkere, stabiele niche van *M. ulcerans* zou zijn waar *M. marinum* niet te vinden is.

1.2.6. Detectieproblemen: lage aantallen en nauw verwante soorten

De lage detectiefrequentie en de moeilijkheid om *M. ulcerans* uit de omgeving in cultuur te brengen wijst erop dat de bacterie er slechts in zeer lage concentraties aanwezig is, in tegenstelling tot andere mycobacteriën die uit dezelfde niches gemakkelijk te detecteren en te isoleren zijn (Portaels et al., 2001). Bovendien kampen de huidige PCR- en kweektechnieken met enkele tekortkomingen waardoor de gevoeligheid en specificiteit niet optimaal zijn, wat de detectie van *M. ulcerans* in de omgeving nog meer belemmert.

Cultuur

M. ulcerans is een trage groeier met een generatietijd van ongeveer 23 uur (Portaels et al., 2001) waardoor hij snel overwoekerd wordt door andere sneller groeiende micro-organismen. Omdat hij veel gevoeliger is voor decontaminatieprocedures in vergelijking met de andere mycobacteriën wordt hij ook door hen gemakkelijk overwoekerd (Palomino en Portaels, 1998). Een oplossing om van contaminerende bacteriën af te raken is het staal te inoculeren in muizen, te wachten tot een lesie ontwikkelt en de bacteriën hieruit te oogsten (Portaels et al., 2008). Herhaaldelijke passages in muizen kunnen worden uitgevoerd totdat een zuivere cultuur bekomen wordt (Portaels et al., 2008). Met deze methode is voor de eerste keer een zuivere en volledig gekarakteriseerde cultuur van *M. ulcerans* uit de omgeving bekomen (namelijk uit de wants *Gerris* sp.) (Portaels et al., 2008). De methode is uiteraard wel zeer omslachtig en succes is niet verzekerd (Portaels et al., 2008).

Specificiteit PCR

Veruit de meeste bacteriën zijn nog niet bestudeerd en beschreven door de mens. Zo wordt bijvoorbeeld door verbeterde moleculaire technieken zoals genotypering en fingerprinting het steeds duidelijker dat slechts een fractie van de omgevingsmycobacteriën gekend zijn (Tortoli, 2006) en is in de loop der jaren gebleken dat er meer heterogeniteit is binnen species van omgevingsmycobacteriën dan daarvoor gedacht (Falkinham, 2002). Er zouden bijvoorbeeld ten minste 3 subspecies van *M. avium* bestaan (Thorel et al., 1990) en binnenin elke ondersoort een groot aantal individuele genotypes (Ritacco et al., 1998; Frothingham en Wilson, 1994).

En inderdaad, recent zijn enkele nieuwe mycobacteriestammen gevonden die net zoals *M. ulcerans* IS2404, IS2606 en het mycolactone-producerende pMUM plasmide bevatten (Mve-Obiang et al., 2005; Hong et al., 2005; Trott et al., 2004; Ranger et al., 2006; Ucko en Colorni., 2005; Chemlal et al., 2002; Stragier et al., 2007). Nu blijkt dus dat men met IS2404 PCR niet uitsluitend *M. ulcerans* detecteert maar ook (minstens) 3 andere omgevingsmycobacteriën, waardoor de resultaten van veel van de voorgaande omgevingsstudies eigenlijk in vraag moeten gesteld worden.

M. liflandii bezit IS2404, IS2606 en het pMUM plasmide en werd in 2004 voor het eerst geïsoleerd uit laboratorium-populaties van geïnfecteerde klauwkikkers (*Xenopus laevis* en *Xenopus tropicalis*) (Trott et al., 2004). Het produceerde een nieuw type van mycolactone: mycolactone E (Mve-Obiang et al., 2005; Hong et al., 2005). Ook *M. pseudoshotsii* bezit deze sequenties en werd voor het eerst geïsoleerd uit gestreepte baarzen in de VSA die gestorven waren door een mycobacteriose (Rhodes et al., 2005). Een bepaalde *M. marinum* stam die IS2404 repeats bezit werd geïsoleerd uit een Franse patiënt (Chemlal et al., 2002). Een andere *M. marinum* stam had het pMUM plasmide (maar zonder IS2404 en IS2606) en werd geïsoleerd uit dode vissen uit de Rode zee (Ucko en Colorni., 2005). Deze laatste *M. marinum* stam en *M. pseudoshotsii* produceren beide het nieuwe mycolactone F (Ranger et al., 2006).

De volledige genotypering van *M. ulcerans* en *M. marinum* en de genetische vergelijking met de andere mycolactone-producerende-mycobacteriën (MPM) heeft echter de fylogenetische verwantschap tussen deze soorten kunnen ophelderen (Stinear et al., 2007; Yip et al., 2007). Alle MPM zouden zeer nauw verwant zijn aan elkaar en stammen allemaal af van een gemeenschappelijke voorganger van *M. marinum* (Yip et al., 2007). Het plasmide is dus niet herhaaldelijke keren uitgewisseld tussen soorten, zoals wel vaker gebeurt met plasmiden (Molin en Tolker-Nielsen, 2003), maar is telkens afkomstig van dezelfde voorouder van *M. marinum* waar het de eerste keer in zou voorgekomen zijn

(Yip et al., 2007). De vier MPM stammen verschillen echter in hun patroon van DNA deleties en pseudogen accumulatie; alleen *M. ulcerans* heeft een significant gereduceerd genoom (Demangel et al., 2009). Zo kan men de drie soorten van elkaar onderscheiden door de typering van verschillende VNTR loci (Stragier et al., 2007; Yip et al., 2007). Ook verschillen ze in het aantal keer dat IS2404, IS2606 en enkele andere repeterende sequenties in hun genoom en plasmide voorkomt. Met deze wetenschap ontwikkelde Fyfe et al. (2007) een real-time PCR test waarmee kwantitatief het aantal repeats van drie sequenties (IS2404, IS2606 en KR: het ketoreductase-B domein van de mycolactone polyketide synthase genen) bepaald kan worden. Met deze testen kan de aanwezigheid van *M. ulcerans* met zekerheid achterhaald worden en zullen worden gebruikt in deze studie.

De drie MPM stammen zijn eerder toevallig ontdekt geweest in dieren met mycobacteriosen. Het is onbekend welke mycobacteriële genotypes juist voorkomen in de (Afrikaanse) natuur, waardoor het niet uit te sluiten is dat er wel meerdere MPM bestaan. Om specifiek *M. ulcerans* te detecteren in de omgeving is het dus noodzakelijk verschillende loci te onderzoeken. Williamson et al. (2008) detecteerden bijvoorbeeld ER (een sequentie aanwezig op pMUM) in een groot aantal stalen uit aquatische ecosystemen in Ghana, maar na VNTR typering bleek slechts een fractie hiervan wel degelijk *M. ulcerans* te zijn.

2. Bacteriën intracellulair in protozoa

2.1. Ontwijken van predatie en bescherming

Veel protozoa, met name amoëboïde protozoa, voeden zich door fagocytose van bacteriën en andere micro-organismen. Bij cel-cel contact invagineert het celmembraan en vangt de amoëbe zijn prooi in een voedselvacuole. Dit zogeheten fagosoom zal samensmelten met enzymenrijke lysosomen om een fagolysosoom te vormen waarin de prooi gedood en verteerd wordt. Als voornaamste predatoren van de bacteriële gemeenschap zijn bacterievore protozoa in staat de samenstelling van die gemeenschap aanzienlijk te beïnvloeden en te doen verschuiven naar morfotypes en genotypes die de predatoren kunnen ontwijken, tolereren of zich ertegen verdedigen (Jürgens en Matz, 2002; Matz en Kjelleberg, 2005). Vaak beschreven beschermingskenmerken zijn toename in grootte (bijvoorbeeld door enorme filamentaire cellen te vormen) (Hahn et al., 1999) en de ontwikkeling van een verhoogde mobiliteit (Matz en Kjelleberg, 2005).

Een andere succesvolle strategie om amoëbenpredatie te overwinnen is door op de één of andere manier de intracellulaire vertering te verhinderen of hieraan resistent te zijn, om

uiteindelijk binnenin de predator te overleven. Bovendien vormt het cytoplasma van de protozoa een aantrekkelijke voedselbron en biedt het stabiele intracellulaire leven bescherming tegen allerlei wisselende uitwendige invloeden. Naast hun actieve trofozoiete vorm komen protozoa vaak voor als cysten (een dikwandige rustvorm), die zeer goed bestand zijn tegen allerlei ongunstige omgevingsinvloeden, zoals extreme temperaturen, droogte en allerlei ontsmettingsmiddelen, waardoor zij en hun bacteriële gasten lange ongunstige periodes kunnen overleven (Storey et al., 2004; Thomas en McDonnell et al., 2007; Sriram et al., 2008). Het is dus niet alleen de ontwijking van predatie die de overlevingskansen van bacteriën met een intracellulaire levenswijze verhoogt.

Voor een hele reeks aan bacteriën, o.a. *Legionella*, *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Mycobacterium* en *Caedibacter*, is aangetoond dat ze in staat zijn intracellulair in protozoa te overleven (Molmeret et al., 2005), althans in het laboratorium. Maar ook in hun natuurlijke habitats blijken amoeben gastheer te zijn. In een studie van Fritsche et al. (1993) bleken 14 van de 57 *Acanthamoeba* culturen uit een waaier van omgevings- en klinische stalen bacteriën intracellulair te herbergen. Ze bleken een stabiele, obligate relatie aan te zijn gegaan met hun gastheren vermits ze niet buiten deze cellen konden gekweekt worden. Bovendien toonden verscheidene studies aan dat door co-cultivatatie met amoeben amoebenresistente bacteriën geïsoleerd kunnen worden uit verschillende types van stalen (Greub en Raoult, 2004).

2.2. Protozoa als reservoir

De bacteriën die in protozoa huizen kunnen mogelijk ook menspathogene soorten of stammen zijn. Protozoa kunnen aldus een omgevingsreservoir vormen voor deze bacteriën van waaruit transmissie naar de mens kan plaatsvinden. Voor een hele reeks van belangrijke menspathogenen werd aangetoond dat ze in staat zijn te overleven en eventueel te repliceren in amoeben, bijvoorbeeld *Legionella pneumophila* (veroorzaker van Legionella) (Rowbotham, 1980), *Escherichia coli* O157 (veroorzaker van diarree) (Alsam et al., 2006), *Coxiella burnetti* (veroorzaker van Q-koorts), (La Scola en Raoult, 2001), *Helicobacter pylori* (veroorzaker van maagzweren) (Winiacka-Krusnell et al., 2002), *Pseudomonas aeruginosa* (veroorzaker van onder andere keratitis) (Michel et al., 1995), *Vibrio cholera* (veroorzaker van cholera) (Thom et al., 1992), en *Listeria monocytogenes* (veroorzaker van listeriose).

Het is eigenlijk pas sinds de ontdekking van het belang van protozoa in de ecologie en evolutie van *Legionella* (Rowbotham et al., 1980) dat er meer en meer aandacht aan bacterie-protozoa relaties wordt geschonken. In de omgeving is *Legionella* een obligate parasiet van amoeben, maar het kan ook macrofagen in menselijke longen infecteren na inademing van aerosolen, meestal uit mensgemaakte watersystemen zoals fonteinen, zwembaden en airconditionings.

Het genus *Mycobacterium* kent bijzonder veel leden die kunnen leven in protozoa.

Jadin (1975) toonde als eerste aan dat *M. leprae* kan overleven in amoeben en al snel ontdekte Krishna Prasad en Gupta (1978) dat *Acanthamoeba castellanii* verscheidene mycobacteriesoorten in hun cytoplasma kon herbergen, inclusief *M. ulcerans*.

Tegenwoordig zijn 34 mycobacteriesoorten bekend die intracellulair kunnen overleven in amoeben, zowel in trofozoïetevorm als cystevorm (Adékambi et al., 2006). Bovendien heeft nog geen enkele gepubliceerde studie een mycobacteriesoort kunnen aantonen die het vermogen *niet* bezit om intracellulair in amoeben te overleven.

Door hun hydrofobiciteit hechten mycobacteriën zich gemakkelijk aan oppervlakken en organisch materiaal maar worden ze ook gemakkelijk gefagocyteerd door protozoa (Strahl et al., 2001) en macrofagen (van Oss et al., 1975). Bovendien bevordert de ondoordringbaarheid van de celwand intracellulaire overleving (Sharbati-Tehrani et al., 2005).

2.2.1. Protozoa als Trojaanse paarden

Protozoa geïnfecteerd met pathogene bacteriën kunnen fungeren als vesikels die deze bacteriën overbrengen naar nieuwe habitats, waardoor ze zo hun transmissievermogen kunnen verhogen (Greub en Raoult, 2004). Cysten kunnen bovendien meegevoerd worden met luchtstromen. Thomas et al. (2004) demonstreerde in een studie naar drinkwaterontsmetting dat protozoa in staat zijn om een reeks van biocidebehandelingen te weerstaan en aldus de overleving en verspreiding van *Legionella* mogelijk maken in aerosolen van gedesinfecteerd drinkwater.

Amoeben kunnen echter veel meer betekenen dan simpele vesikels: bacteriën kunnen ze gebruiken als Trojaans paard (Barker en Brown, 1994). Amoeben worden blijkbaar niet altijd tegengehouden door de eerste linie verdediging van het immuunsysteem bij mensen en zouden zo intracellulair verstopte bacteriën binnen in het lichaam smokkelen (Greub en Raoult, 2004). Cirillo et al. (1997) toonde bijvoorbeeld aan dat wanneer een amoebencultuur met intracellulaire *M. avium* in muizen wordt geïnoculeerd de bacteriën

beter in staat zijn het darmepitheel te koloniseren dan wanneer een vrijlevende *M. avium*-cultuur wordt geïnoculeerd.

2.2.2. Protozoa als evolutionaire kribbes

Amoeben zijn fagocyten en kennen veel gelijkenissen met de zoogdierfagocyten, vooral macrofagen (Cosson en Soldati, 2008). De adaptaties die het bacteriën mogelijk maken intracellulair te leven in protozoa kunnen ook van pas komen wanneer ze geconfronteerd worden met andere fagocyterende cellen, zoals macrofagen uit meercelligen. Bacteriën die een stabiele associatie hebben ontwikkeld met hun amoëboïde gastheer zouden eerder door toeval terecht kunnen komen in zoogdieren, daar voldoende aangepast zijn om intracellulair te overleven en zo optreden als opportunistisch omgevingsparasiet. Men spreekt van protozoa als “evolutionaire kribbe” voor de ontwikkeling van aanpassingen die het mogelijk maken macrofagen te infecteren (Greub en Raoult, 2004). *Legionella* bijvoorbeeld, dat vóór de uitvinding van airconditioning en whirlpools nooit mensen infecteerde, vindt in de pathogeen-dodende macrofagen een uitstekende niche om in te vermenigvuldigen. *M. marinum* gebruikt gelijkaardige mechanismen om zoogdiermacrofagen en *Dictyostelium discoideum* te invaseren (Solomon et al., 2003). *E. coli*O157 stammen zijn aangepast om in amoeben te overleven en zijn virulenter dan gewone *E. coli* (Alsam et al., 2006). Bepaalde mycobacteriesoorten die slechts zelden mensen infecteren (*M. smegmatis*, *M. fortuitum* en *M. phlei*) veroorzaken uiteindelijk de dood van hun gastheeramoeben in tegenstelling tot de pathogene soorten *M. avium* en *M. ulcerans* die de amoeben blijkbaar geen schade berokkenen (Cirillo et al., 1994, Eddyani et al., in voorbereiding).

Op moleculair en cellulair vlak zijn ook een aantal gelijkenissen te zien tussen het intracellulaire leven van *L. pneumophila* en *M. avium* in amoeben en in macrofagen. Het gebruik van een specifiek fagocytosemechanisme, “coiling fagocytose”, is geobserveerd bij zowel amoeben als macrofagen (Bozue en Johnson, 1996). Na de opname weerstaan *L. pneumophila* en *M. avium* de vertering van zowel amoeben als macrofagen door de fusie tussen de fagosoom en lysosomen te verhinderen (Bozue en Johnson, 1996; Cirillo et al., 1997). Inhibitie van fagosoom-lysosoom fusie wordt ook door de pathogene mycobacteriën *M. tuberculosis* en *M. marinum* gebruikt om te overleven in macrofagen (Cosma et al., 2003).

Door de grote overeenkomsten tussen amoeben en macrofagen en door het gemak waarmee amoeben gekweekt en genetisch gekarakteriseerd kunnen worden, wordt het trouwens steeds meer aangemoedigd om modelamoeben te gebruiken in studies naar de interactie van pathogenen en macrofagen, i.p.v. de monocytten zelf (Cosson et al., 2008).

2.2.3. Intracellulair leven in protozoa als oefening voor virulentie

Veel bacteriën die intracellulair kunnen leven in amoeben en macrofagen zijn eerder facultatief intracellulair en leven naargelang de omstandigheden ook buiten de gastheer. Zelfs *L. pneumophila* kan overleven in zelf gemaakte biofilms zonder de aanwezigheid van hun amoebe gastheer (Murga et al., 2001). Maar oefening baart kunst: studies op de bacteriën *L. pneumophila*, *M. avium* en *Salmonella enterica* geven aan dat een intracellulair verblijf aanleiding kan geven tot een fenotype dat beter in staat is om andere cellen te infecteren en intracellulair te repliceren (Cirillo et al., 1997; Cirillo et al., 1999; Rasmussen et al., 2005).

In vergelijking met *M. avium* gekweekt in vloeibaar medium, dringen bacteriën gegroeid in *A. castellani* 8 tot 10 keer efficiënter binnen in volgende *A. castellani* culturen, menselijke epitheliale cellen en macrofagen (*in vitro*) (Cirillo et al., 1997). Wanneer de intracellulaire bacteriën geogst werden en opnieuw gegroeid in medium zonder amoeben, verloren ze hun capaciteit om efficiënter andere amoeben te infecteren (Cirillo et al., 1997). Dit toont aan dat tijdens het intracellulair verblijf van *M. avium* geen selectie voor invasieve mutanten is opgetreden en dat de populatie waarschijnlijk een fenotypische verandering onderging (Cirillo et al., 1997), hoewel de aan- of afwezigheid van genen vóór en na intracellulaire groei niet specifiek werd nagegaan. Door horizontale gentransfer (bijvoorbeeld van plasmiden) kunnen dense bacteriepopulaties namelijk snel evolueren (Molin en Tolker-Nielsen, 2003).

Amoeben-gegroeide *M. avium* bleek ook *in vivo* virulenter te zijn voor muizen in vergelijking met *M. avium* gegroeid in gewoon medium: ze waren beter in staat de muizendarmen te koloniseren en vermenigvuldigden zich tot hogere aantallen in de lever en milt (Cirillo et al., 1997). *L. pneumophila* gegroeid in *A. castellani* was ook beter in staat *in vitro* monocytten te infecteren en er binnenin te repliceren in vergelijking met bacteriën gegroeid in verrijkt medium, en waren *in vivo* virulenter voor muizen (Cirillo et al., 1999). Ook in deze studie kan eigenlijk niet met zekerheid gezegd worden dat een fenotypische verandering, dan wel selectie en evolutie aan de basis liggen van de virulentieverhoging.

Het zijn trouwens niet alleen virulentiekenmerken die kunnen veranderen na een intracellulair verblijf, ook werden *M. avium* en *L. pneumophila* hierdoor minder gevoelig aan allerlei antibiotica (Miltner en Bermudez, 2000; Barker et al., 1995) en biocides (Barker et al., 1992).

2.3. Amoeben en *Mycobacterium ulcerans*

2.3.1. *M. ulcerans* intracellulair in de mens?

Door de aanwezigheid van grote globi extracellulaire bacillen in necrotische regio's werd lang gedacht dat *M. ulcerans* uitsluitend of voornamelijk extracellulair leeft in de mens, in tegenstelling tot andere pathogene mycobacteriën. Deze accumulatie van extracellulaire bacillen in necrotische regio's is echter ook al geobserveerd in lesies veroorzaakt door *M. tuberculosis*, *M. haemophilum* and *M. marinum* (Dobos et al., 1999; Kathuria et al., 2006). Bovendien zou het mycolactone dat *M. ulcerans* produceert fagocytose door macrofagen inhiberen *in vitro* (Adusumilli et al., 2005) en zou de bacterie niet in staat zijn intracellulair in macrofagen te groeien omdat ze die massaal lyseerden (Adusumilli et al., 2005; Rastogi et al., 1999). Anderzijds greep significante inhibitie van fagocytose slechts plaats bij toediening van hoge concentraties van het toxine terwijl de reële concentratie in de geïnfecteerde huid niet bekend is (Portaels et al., 2009). Ook werden zeer hoge infectiehoeveelheden gebruikt. Wanneer door Torrado et al. (2007) lagere concentraties werden gebruikt kon *M. ulcerans* wél intracellulair in macrofagen overleven én groeien. Daarenboven werden in muizenpoten geïnjecteerd met *M. ulcerans* en in BU-biopsies macrofagen geobserveerd met grote aantallen intracellulaire bacillen (Torrado et al., 2007). In deze studie waren de bacillen gedurende het hele infectieproces geassocieerd met de neutrofielen, maar in een andere studie zou *M. ulcerans* alleen gedurende de vroege fases van infectie transiënt intrafagocytair verblijven (Coutanceau et al., 2005).

Het is dus waarschijnlijk niet meer gerechtvaardigd om *M. ulcerans* te zien als een buitenbeentje van de mycobacteriën; de bacterie kent wel degelijk een intracellulair bestaan.

2.3.2. Rol van amoeben in verspreiding en virulentie van *M. ulcerans*?

Hierboven is uitgelegd dat veel *in vitro* studies aantonen dat mycobacteriën vlot een relatie aangaan met amoeben en dat amoeben een selectieve kracht kunnen zijn voor genotypes en fenotypes die virulenter zijn voor zoogdieren. Deze achtergrond leidde tot de vraag of ook *M. ulcerans* zo'n soort relatie met amoeben kan aangaan.

Uit veilige waterbronnen (bv. gepompt grondwater, regenwatercollectoren) in Benin konden Eddyani et al. (2008) vaker amoeben isoleren in BU endemische dorpen dan in dorpen met een lage BU endemiciteit. Hoewel geen *M. ulcerans* werd gedetecteerd, werden andere mycobacteriesoorten uitsluitend gedetecteerd in de BU endemische gemeenschappen, niet in laag-endemische dorpen, en werden verscheidene

mycobacteriën geïsoleerd die intracellulair in micro-organismen aanwezig waren (Eddyani et al., 2008).

Eddyani et al. (in voorbereiding) kon verder aantonen dat *M. ulcerans* kan overleven in grote vacuoles in *A. polyphaga* zonder de amoeben schade te berokkenen. Ook zuiver mycolactone had geen effect op de amoeben (Eddyani et al., in voorbereiding).

Belangrijker is dat passage door amoeben selecteerde voor virulentie eigenschappen. Decennia-oude *M. ulcerans* stammen hadden hun virulentieplasmide pMUM verloren door herhaaldelijke laboratoriumpassages en veroorzaakten geen zwelling wanneer ze geïnoculeerd werden in muizen (Oliveira et al., 2005). Wanneer ze echter een intracellulair verblijf in amoeben ondergingen bleken ze het plasmide wel te bezitten en waren in staat een zwelling te veroorzaken bij muizen (Eddyani et al., in voorbereiding). Waarschijnlijk bestond de oude stam voor het merendeel uit individuen die het plasmide verloren hadden (vermits bacteriën plasmiden gemakkelijk verliezen en op pMUM waarschijnlijk geen genen liggen die een fitness voordeel opleveren voor groei op voedingsmedium), maar bezaten een klein aantal individuen dit plasmide toch nog. Deze virulentere bacteriën overleefden en vermenigvuldigden op de één of andere manier beter in *A. polyphaga*, en zo evolueerde de niet-virulente stam naar een virulente stam. Het is niettemin niet uitgesloten dat naast evolutie ook een expressiewijziging optrad door amoebenpassage, zoals waarschijnlijk het geval was toen Cirillo et al. (1997) observeerde dat *M. avium* na amoebenpassage virulenter werd.

Door deze bevindingen kan men zich afvragen of *M. ulcerans* ook in natuurlijke omgevingen interacties aangaat met amoeben. Mogelijk bestaat er dan een positieve selectie voor virulentie-eigenschappen, waardoor de virulentie van *M. ulcerans* in de omgeving onderhouden zou blijven en zo ook zijn vermogen om mensen te infecteren

3. Hypothesen

In deze studie onderzoeken we of mycobacteriën in de natuur een intracellulaire levenswijze in protozoa kennen. In het bijzonder is deze studie deel van het onderzoek naar het reservoir van *M. ulcerans*, en zullen we nagaan of amoeben in de natuur gastheren kunnen zijn voor deze bacterie.

We zullen proberen antwoorden op de volgende vragen:

1. Leven mycobacteriën in aquatische ecosystemen in Ghana intracellulair in micro-organismen?
2. Zijn amoeben in aquatische ecosystemen in Ghana geassocieerd met mycobacteriën, met name *M. ulcerans*?

3. Is er een relatie tussen het zuurstofgehalte, pH en temperatuur van het water en de verspreiding van mycobacteriën en amoeben?
4. Verschilt het zuurstofgehalte, de pH en de temperatuur van waterlichamen tussen Buruli ulcerus endemische gebieden en niet-endemische gebieden?
5. Is er een relatie tussen BU endemiciteit en de verspreiding van mycobacteriën, met name intracellulaire mycobacteriën?
6. Is er een relatie tussen BU endemiciteit en de associatie van mycobacteriën, met name *M. ulcerans*, en amoeben?

Om deze hypothesen te onderzoeken werden waterlichamen bemonsterd die frequent gebruikt worden door de bewoners van het meest BU endemische gebied van Ghana. Gelijkaardige gemeenschappen zonder BU liggen hier echter dicht bij, en werden vergeleken met de BU endemische dorpen.

We namen stalen daar waar we micro-organismen als mycobacteriën en protozoa verwachten: als plankton in de waterkolom, georganiseerd in biofilms en in voedselrijk detritus. Bovendien analyseerden we enkele fysisch-chemische parameters (O₂, pH, temperatuur) die van belang kunnen zijn voor de verspreiding van deze micro-organismen.

De aanwezigheid van mycobacteriën werd aangetoond door middel van PCR en kweek van zowel intra- als extracellulaire mycobacteriën. Ten slotte kweekten we de aanwezige amoeben en gingen we na of mycobacteriën mee groeien met deze amoebenculturen.

II. Materialen en methoden

Een overzicht van de gebruikte methodes is te vinden in bijlage 1.

1. Staalname

Water, biofilm en detritus stalen werden verzameld in en rond waterlichamen van zeven gemeenschappen rond Agogo (Asante Akim North District, Ashanti Region, Ghana) (Figuur 2, Tabel 1). Vijf hiervan (Ananekrom, Nhyieso, Bebuso, Dukusen en Serebuoso) worden als hoog endemisch voor BU beschouwd (Tabel 2) en twee (Mageda en Pataban) als laag endemisch, vermits hier geen patiënten met bevestigde BU wonen.

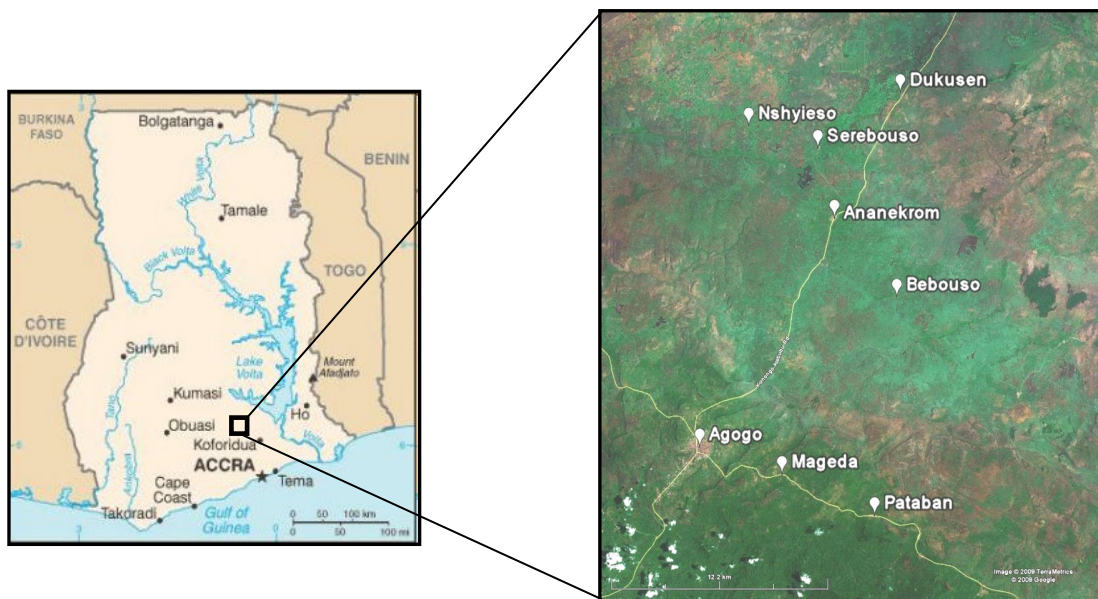
Alle bezochte waterlichamen waren redelijk ondiep (of stalen werden enkel genomen aan ondiepe delen), werden beschaduwd door omringende vegetatie en bevatten traag stromend water. De lokale bevolking komt geregeld met het water in contact tijdens wandelingen, visvangst en gebruiken het water als drinkwater, om zichzelf en kleren te wassen, om mee te koken en als recreatie.

In elk waterlichaam namen we stalen van vier verschillende habitats van micro-organismen. Water werd uit het midden van de beek of poel gehaald en 3 L hiervan werd gezeefd (poriegrootte 100 μ m) en gefilterd (poriegrootte 0,45 μ m) met behulp van een vacuümpomp. Met scalpels en wattenstaafjes werden biofilms van kruidachtige planten (over een lengte van 20 cm) en hout (over een oppervlakte van 10 cm²) geschraapt. De kruidachtige planten werden niet geïdentificeerd, maar waren oeverplanten die deels onder water stonden zodat er daar een biofilm groeide. Als tweede biofilmsubstraat bemonsterden we hout als deel van levende bomen aan de oever of van grote dode takken of stammen in het water. Ten slotte vulden we 50 mL falcontubes met detritus. In het water zo dicht mogelijk bij elk staal werd eveneens de O₂ verzadiging, de pH en de temperatuur opgemeten met een HI-98127 waterproof pH meter en een HI-9146-04 Portable DO Meter for Field Application waarmee we eveneens de temperatuur maten (Hannah instruments, Providence, US).

In oktober werden 4 hoog endemische dorpen bezocht en werd per dorp 1 tot 2 waterstalen, 10 biofilmstalen (5 op kruidachtige planten en 5 op hout) en 5 detritusstalen genomen. In november bezochten we deze dorpen opnieuw en een ander hoog endemisch dorp en werd 1 waterstaal, 6 biofilmstalen en 3 detritusstalen per dorp verzameld. We namen toen ook stalen in de laag endemische dorpen waar we per dorp 1 waterstaal, 10 biofilmstalen en 5 detritusstalen namen.

Tabel 1. Namen van de dorpen en waterlichamen die we bemonsterden en hun locatie.

Dorp	Bemonsterd waterlichaam	Coördinaten
Ananekrom	Egyaah river	N06°54,887' - W001°00,794'
Nhyieso	Esuo Efi-river	N06°57,032' - W001°05,5661'
Serebuoso	Onvam (Tifi) river	N06°56,923' - W001°01,358'
Dukusen	Onwan river	N06°58,636' - W000°59,002'
Bebuso	Pupunasoë river	N06°52,594' - W000°59,057'
Mageda	Abena supuni river	N06°47,277' - W001°02,505'
Pataban	Pataban river	N06°46,414 - W000°59,641'



Figuur 2. Geografisch overzicht van de bemonsterde dorpen.

Tabel 2. Aantal bevestigde gevallen van Buruli ulcus in hoog endemische gemeenschappen in 2006-2007. BU werd bevestigd door klinische diagnose in het Agogo Presbyterian Hospital en bacteriologische diagnose in het Kumasi Centre for Collaborative Research.

Dorp	Bacteriologisch bevestigde gevallen (min. 1 positieve test)	Totaal aantal getest (na klinische diagnose)	Populatiegrootte	Prevalentie
Ananekrom	39	50	1825	2,14 %
Serebuoso	12	15	1192	1,01 %
Nhyieso	14	17	1337	1,05 %
Dukusen	3	5	632	0,47 %
Bebuso	7	7	903	0,76 %

2. Verwerking en oplossing van de stalen

De filters van de waterfiltraten werden verknipt in een 50 mL-falcon buis, 15 mL PBS werd toegevoegd en na hevig schudden loste het filtraat op. Biofilms werden eveneens gesuspendeerd in 15 mL PBS in 50 mL-falcon buizen na hevig schudden. Detritusstalen werden overgebracht in stomacher zakjes en 50 mL 0,2% Tween80 in PBS werd toegevoegd. We kneedden de zakjes voor 1 minuut waardoor de mycobacteriën vrij kwamen in de Tween oplossing. De mengeling lieten we 30 minuten bezinken en 15 mL van de bovenste laag werd overgepipeteerd in een 50 mL falcon buis.

Van deze suspensies werd 250 μ L gebruikt voor DNA extractie en PCR analyses, en 10mL voor de kweek van mycobacteriën.

3. Amoebenkweek

Amoeben uit de stalen werden in kweek gebracht op 1,5% agar platen (zonder nutriënten) bestreken met *E. coli*, zoals beschreven in Page (1976) en Eddyani et al. (2008). Op de bodems werden ofwel een stukje filter van het waterfiltraat gelegd, een druppel van de opgeloste biofilms of een stukje van het detritusstaal. De platen werden geïncubeerd op 30°C en elke dag gelezen onder de lichtmicroscop tot dat groei optrad. Amoeben uit eenzelfde staal die morfologisch verschillend waren werden gescheiden. Om zuivere amoebenculturen te verkrijgen werd een stukje agar zonder contaminerende microben uit de bodem gesneden en op een nieuwe agarplaat gelegd. Stukjes agarbodem met amoeben werden ook in 2 mL eppendorf buizen bewaard voor later gebruik en voor transport van Ghana naar België.

Wanneer culturen vrij waren van contaminaties of wanneer duidelijk werd dat het onmogelijk was om zuivere culturen te verkrijgen door middel van subculturen, werden de amoeben van de agarbodem geschraapt met behulp van 1,5 mL PBS en een entnaald. De vloeistof werd opgezogen met een pasteurpipet en overgebracht in een 2 mL buisje. Enkele druppels hiervan werden gefixeerd op een draagglaasje en gekleurd met de methode van Ziehl-Neelsen: carbol-fuchsine werd over de plaatjes gegoten en na 25 minuten weggewassen door zure alcohol, daarna werd een achtergrondkleuring van methyleenblauw aangebracht voor 2 minuten. Aan de rest van de oplossing werd 0,5 % SDS toegevoegd (uiteindelijke concentratie) om de amoeben te lyseren. DNA extractie met de methode van Boom (zie §2.5) werd uitgevoerd op 250 μ L van deze oplossing. Amoebenlysaten die positief testten voor IS2404 met real-time PCR (zie §7) werden geënt op Löwenstein-Jensen (LJ) medium om de aanwezige mycobacteriën te kweken.

4. Mycobacteriënweek

Elk staal werd verdeeld over 2 falcon buizen: 5 mL bestemd om alle aanwezige mycobacteriën te isoleren, de andere 5 mL om enkel die mycobacteriën te isoleren die intracellulair in micro-organismen vertoefden. Dit laatste werd verwezenlijkt door overnacht te incuberen in 40 µg/mL kanamycine, een antibioticum dat extracellulaire mycobacteriën doodt (Menashe et al., 2008; Eddyani et al., 2008). Na 5 minuten aan 500 x g te centrifugeren, te decanteren en te resuspenderen in 4,5 mL PBS, werd 0,5 mL 5%SDS toegevoegd dat de aanwezige amoeben en andere eukaryote cellen lyseert. Mycobacteriën werden geconcentreerd in het pellet door te centrifugeren aan 4000 x g voor 20 minuten en werden opnieuw geresuspendeerd in 5mL PBS.

Decontaminatie met de oxaalzuurmethode om andere organismen dan mycobacteriën te doden (Portaels et al., 1988) werd uitgevoerd op 5mL van het oorspronkelijke staal en op 5mL die de intracellulaire mycobacteriën bevat. Achtereenvolgens werd 5 mL 0,2% malachietgroen, 5 mL 1N NaOH en 1 mL 0,8% cycloheximide toegevoegd dat we 30 minuten lieten incuberen op kamertemperatuur, waarna 15 minuten aan 4000 x g werd gecentrifugeerd. Het pellet werd geresuspendeerd in 5% oxaalzuur en na 20 minuten incubatie op kamer temperatuur werd dit gecentrifugeerd voor 15 minuten aan 4000 x g. Dit pellet werd in 1 mL PBS opgelost en 3 druppels hiervan werden geënt op LJ-medium. De geïnoculeerde cultuurmedia bewaarden we op 30°C en werden elke week gelezen. Bij groei werd een uitstrijkje gemaakt dat na fixatie gekleurd werd met de methode van Ziehl-Neelsen (zie §3) voor de detectie van mycobacteriën. Wanneer toch andere organismen dan mycobacteriën op het medium groeiden werd de decontaminatieprocedure opnieuw uitgevoerd. Wanneer het uitstrijkje uit meer dan 80% mycobacteriën bestond, werd een beetje van de cultuur opgelost in 400µL 1X TE buffer in een 1,5 mL eppendorfbuisje. Het DNA werd geëxtraheerd door 5 minuten te koken in een waterbad. 16S rRNA PCR en vervolgens sequencing ter identificatie van de mycobacteriën werd uitgevoerd zoals hieronder beschreven.

Voor transport van Ghana naar België werd een klein deel van de culturen overgeënt op LJ medium gegoten in een eppendorf buisje.

5. DNA extractie

DNA uit de ruwe stalen en uit amoebencultuur-lysaat werd geëxtraheerd met een gemodificeerde methode van Boom (Boom et al., 1990; Portaels et al., 2008; Durnez et al., 2009). Van de ruwe stalen of van de amoebensuspensie werd 250 µL toegevoegd aan 250 µL 2x lysis buffer, 50 µL proteïnase K en ongeveer 200 µL glasparels. Dit werd overnacht al schuddend geïncubeerd bij 60°C om alle cellen te breken. Dan werd 40 µL

diatomeeënaarde-oplossing (bereid door 10 g diatomeeënaarde verkregen van Sigma Aldrich Chemie GmbH [Steinheim, Duitsland] op te lossen in 50 mL 0,37 % HCl) toegevoegd en geplaatst in een schuddende incubator voor 60 tot 120 minuten op 37°C. Hierna centrifugeerden we dit kortstondig aan 10000 x g en het pellet werd geresuspendeerd in 900 µL 70% ethanol door te vortexen. Deze stap werd nog eens herhaald met ethanol, en vervolgens één maal met aceton. Het residu lieten we in een thermoblok bij 50°C drogen, waarna we het oplossen in 100 µL 1x TE buffer en dit gedurende 20 minuten op 55°C lieten incuberen, terwijl we om de minuut vortexden. De mengeling werd kortstondig gecentrifugeerd aan 10000 x g en het supernatans (vrij van PCR inhiberend diatomeeënaarde) werd verder gebruikt voor PCR-analyse. PCR op DNA-extracten van de ruwe stalen was regelmatig geïnhibeerd, zodat we DNA-extractie van de ruwe stalen opnieuw uitvoerden m.b.v. PowerSoil - DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories), volgens de instructies van de fabrikant.

6. 16S rRNA nested PCR en gel-elektroforese

In deze nested PCR wordt het 16S rRNA gen van alle mycobacteriën geamplificeerd aan de hand van 2 primerparen (Portaels et al., 1996): P1 (5'-TGCTTAACACATGCAAGTCG-3') en P2new (5'-TCTCTAGACGCGTCCTGTGC-3') voor de eerste run en P7 (5'-CATGCAAGTCGAACGGAAAGG-3') en P16new (5'-AAGCCGTGAGATTTACGAACA3') voor de tweede run.

Vijf µL (voor DNA extracten afkomstig van de ruwe stalen of de amoebenculturen) of 2 µL (voor DNA extracten afkomstig van mycobacterieculturen) DNA extract (in de eerste run) of 1 µL amplicon van de eerste run (in de tweede run) werd toegevoegd aan een PCR reactiemix van volgende producten (in hun uiteindelijke concentraties): 1x PCR buffer (1,65 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris en 0,1% Triton X-100), 0,2 mM dNTP's, 0,25 pmol/µL van de respectievelijke primers en 0,02 U/µL Taq polymerase, en deze mengeling werd aangelengd tot 50 µL (eerste run) of 25 µL (tweede run) met Milli-Q water. Als inhibitiecontrole van de ruwe stalen werd elk staal twee keer geanalyseerd: eenmaal met 2 µL extra Milli-Q water in de eerste run en eenmaal met 2 µL van 0,28 µL 10⁻⁴ M DNA van *M. tuberculosis* toegevoegd in de eerste run. Als negatieve controle werd in de eerste run in plaats van DNA-extract Milli-Q water gebruikt. Als positieve controle voor de eerste run voegden we 5 µL 0,28 10⁻⁵ M DNA en 5 µL 0,28 10⁻⁴ M DNA van *M. tuberculosis* toe, voor de tweede run 1 µL 0,28 10⁻⁴ M DNA en 1 µL 0,28 10⁻³ M DNA van *M. tuberculosis*.

Voor de eerste run werd het volgende programma gebruikt: 1 cyclus van 10 seconden aan 92°C; 1 cyclus van 5 seconden aan 94°C; 39 cycli van 45 seconden aan 94°C voor

denaturatie van het DNA, gevolgd door 45 seconden aan 56°C voor de annealing en 45 seconden aan 72°C voor de extentie; en 1 cyclus van 10 seconden aan 72°C. Voor de tweede run werd een gelijkaardig programma gebruikt: 1 cyclus van 10 seconden aan 92°C, 1 cyclus van 5 seconden aan 94°C, 24 cycli van 45 seconden aan 94°C voor denaturatie van het DNA, gevolgd door 45 seconden aan 58°C voor de annealing en 45 seconden aan 72°C voor de extentie; en 1 cyclus van 10 seconden aan 72°C.

Een 2% agarose mix (1 g agarose en 1 g small fragment agarose in 100 µL TAE buffer) werd opgelost door te koken in een microgolfoven. 4 µL van het amplicon van de tweede run werd gemengd met 1 µL ladingsbuffer. Dit en een 100 tot 1000 basenpaarladder werden in de welletjes gepipetteerd van de gestolde gel. We lieten de amplicons voor 20 minuten migreren aan 100 Volt, waarna de gel voor 20 minuten werd geïncubeerd in een 1 µg/100 mL ethidium-bromide/TAE bad en een foto genomen werd.

7. TaqMan® real-time PCR

We gebruikten twee multiplex real-time PCR testen voor de specifieke detectie van *M. ulcerans* (Fyfe et al., 2008). De eerste beoogt de amplificatie van de IS2404 insertie sequentie en van een interne positieve controle (IPC) (TaqMan® Exogenous Internal Positive Control, Applied Biosystems), een stuk exogeen DNA dat eventuele inhibitie van de reactie monitort. De tweede test amplificeert de IS2606 insertie sequentie en het ketoreductase-B domein (KR) van de mycolactone polyketide synthasegenen van *M. ulcerans*. Amplificatie en detectie werden uitgevoerd door Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (in NMIMR, Accra, Ghana), Rotogene-3000 Real-Time Thermo cycler (Corbett Research, Sydney, Australia) en iCycler (Bio-Rad) (in ITG, Antwerpen). De gebruikte primers en probes staan beschreven in tabel 3.

Tabel 3. Primers en probes gebruikt in de TaqMan real-time PCR voor detectie van *M. ulcerans* (Fyfe et al., 2007)

	Forward Primer	Reverse Primer	Probe
IS2404	AAAGCACCACGCAGCATCT	AGCGACCCCAGTGGATTG	6 FAM-CGTCCAACGCGATC-MGBNFQ
IS2606	CCGTCACAGACCAGGAAGAAG	TGCTGACGGAGTTGAAAAACC	VIC-TGTCGGCCACGCCG-MGBNFQ
KR	TCACGGCCTGCGATATCA	TTGTGTGGGCACTGAATTGAC	6 FAM-ACCCCGAAGCACTG-MGBNFQ

De probes van IS2404 en KR zijn aan het 5' einde gelabeld met de fluorescente kleurstof 6 FAM (6-carboxyfluoresceïne) en aan het 3' einde met een non-fluorescente quencher (Applied Biosystems). De probe van IS2606 is aan het 5' einde gelabeld met de fluorescente kleurstof VIC en aan het 3' einde met een non-fluorescente quencher (Applied Biosystems). De interne positieve controle heeft een VIC-gelabelde probe met een TAMRA™ kleurstof gelabelde quencher (Applied Biosystems).

De twee PCR reactiemixen, beide in een volume van 25µL, bestond uit 1 x TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,9 µM van elke primer en 0,1 µM van elke probe (uiteindelijke concentraties), 4,75 µL Milli-Q water en 1 µL DNA extract. De IS2404/IPC multiplex bevatte bovendien 1 x TaqMan® Exogenous IPC Mix en 1 x TaqMan® Exogenous IPC DNA (Applied Biosystems). Als negatieve controle voor IS2404 of IS2606/KR werd in plaats van DNA extract 1 µL 1 x TE gebruikt. Als geen-amplificatie controle werd in de IS2404/IPC test in plaats van DNA extract 2,5 µL van 10 x TaqMan® Exogenous IPC Block toegevoegd dat alle amplificatie (inclusief die van IPC) inhibeert. Als positieve controle en als basis voor de constructie van een ijklijn dat de kwantificatie van het aantal IS2404 of IS2606/KR kopieën aanwezig in het DNA extract toelaat, werd aan drie welletjes respectievelijk 1 µL van $0,924 \times 10^{-7}$ µg/µL *M. ulcerans* DNA (komt overeen met 3000 kopieën van IS2404), 1 µL van $0,924 \times 10^{-8}$ µg/µL *M. ulcerans* DNA (komt overeen met 300 kopieën van IS2404), 1 µL van $0,924 \times 10^{-9}$ µg/µL *M. ulcerans* DNA (komt overeen met 30 kopieën van IS2404) toegevoegd.

Het volgende programma verzorgde amplificatie: 1 cyclus van 50°C voor 2 minuten, 1 cyclus van 95°C voor 10 minuten (activatie van AmpliTaq Gold enzyme) en 40 cycli van 95°C voor 15 seconden (denaturatie) en 60°C voor 1 minuut (annealen en extentie).

Stalen waarvan de DNA extracten waren geïnhibeerd werden opnieuw geanalyseerd door gebruik te maken van de TaqMan® Environmental Mastermix i.p.v. de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Deze mastermix laat PCR toe van extracten met een hoog aantal inhibitoren.

8. Statistische tests

Betrouwbaarheidsintervallen van proportionele variabelen die een binomiale verdeling volgden werden bepaald aan de hand van de methode van Sterne met het softwareprogramma Quantative Parasitology (Rozsa et al., 2000). Significantie van random effects werd getest met het programma WinBUGS (Gilks et al., 1994). Alle andere tests werden uitgevoerd in het statistisch software programma "R" (v2.9.0, R

Development Core Team 2009). P-waarden kleiner dan 0,05 werden als significant beschouwd.

Lineaire mixed effects modellen werden opgesteld waarbij O₂-verzadiging, pH en temperatuur gerelateerd werden endemiciteit aan en het type van habitat (water, biofilm op kruiden, biofilm op hout en detritus), terwijl gecorrigeerd werd voor het eventuele effect van “waterlichaam” (meestal slechts 1 per dorp) dat genest was in “endemiciteit” en als random werd beschouwd. De significantie van het effect van endemiciteit en het type van habitat op de O₂-verzadiging, de zuurtegraad en de temperatuur van het water werd getest door een lineair mixed effects model op te stellen waar deze parameters uit weggelaten werden. Het nieuwe en het volledige model werden met elkaar vergeleken met een Analysis of Variance (ANOVA). Als de variabelen significant verschilden in de staalname van oktober t.o.v. november dan werd dit tijdseffect in het model gehouden, anders werd het eruit gelaten omdat we dit effect niet specifiek wilden testen.

Wanneer er een significant effect was van ‘type van habitat’ dan werden de gemiddelde O₂ verzadiging, pH en temperatuur van de bemonsterde habitats twee-aan-twee vergeleken met een Tukey test.

Alle parameters werden eveneens in een gegeneraliseerd mixed model voor binomiaal verdelingen gegoten. De significantie van elke parameter werd getest door een nieuw gegeneraliseerd mixed model te maken waaruit de bewuste parameter werd weggelaten. Met een ANOVA werd dan getest of de twee modellen significant van elkaar verschillen. Op die manier testten we dus of het voorkomen van mycobacteriën (algemeen, specifiek intracellulair of geassocieerd met amoebenculturen), gecontamineerde LJ-buizen en de isolatiefrequentie van amoeben verschilde naargelang de BU endemiciteit van het bemonsterde gebied, het type van habitat en naargelang de zuurtegraad, de pH-waarde en de temperatuur van het water rond het staal. Er werd gecorrigeerd voor het eventuele effect van “waterlichaam” dat genest was in “endemiciteit” en als random beschouwd werd. Als de variabelen significant verschilden in de staalname van oktober t.o.v. november dan werd dit tijdseffect in het model gehouden, anders werd het eruit gelaten omdat we dit effect niet specifiek wilden testen.

De significantie van het effect van ‘waterlichaam’ (een random effect genest in ‘endemiciteit’) werd telkens getest met Bayesiaanse statistiek in het programma WinBUGS, waarbij 50000 iteraties werden gebruikt. Een gegeneraliseerd lineair model met een logit-functie en Bernoulli respons verdeling werd opgesteld met dezelfde

parameters als hiervoor vermeld. Resultaten werden als significant beschouwd wanneer het 95% betrouwbaarheidsinterval (BI) het getal 0 (= geen effect) niet bevatte.

We gebruikten een Fisher exact test om de patronen van het voorkomen van mycobacteriën met die van amoeben te vergelijken.

III. Resultaten

1. Fysisch-chemische parameters

1.1. Zuurstof

De O₂ verzadiging van het water rond de stalen verschilde significant tussen de verschillende types van habitats ($p < 0.001$, $\chi^2_3 = 19.18$); zo hadden de detritusstalen een significant lager zuurstofgehalte dan de waterstalen ($p = 0.01$), maar de andere habitats verschilden niet significant aan elkaar wanneer ze twee-aan-twee vergeleken werden (Tabel 4). Globaal gezien verschillen waterlichamen significant van elkaar qua zuurstofgehalte (geschat effect: -3.2; 95% BI: -4.7 tot -1.8) (Figuur 3). Het zuurstofgehalte was gemiddeld 22,8% hoger in waterlichamen uit de bezochte laag BU endemische gebieden dan uit de hoog BU endemische gebieden, maar dit verschil was niet significant ($p = 0.07$, $\chi^2_1 = 3.21$).

1.2. pH

De pH van het water rond de stalen verschilde niet significant tussen hoog BU endemische en laag BU endemische gebieden ($p = 1$, $\chi^2_1 = 0$) of tussen verschillende waterlichamen (geschat effect: 0.05; 95% BI: -9.10^{-4} tot 0,10) (Tabel 5). De pH verschilde ook niet significant tussen water, biofilms of detritus ($p = 0.52$, $\chi^2_3 = 2.26$) (Tabel 5).

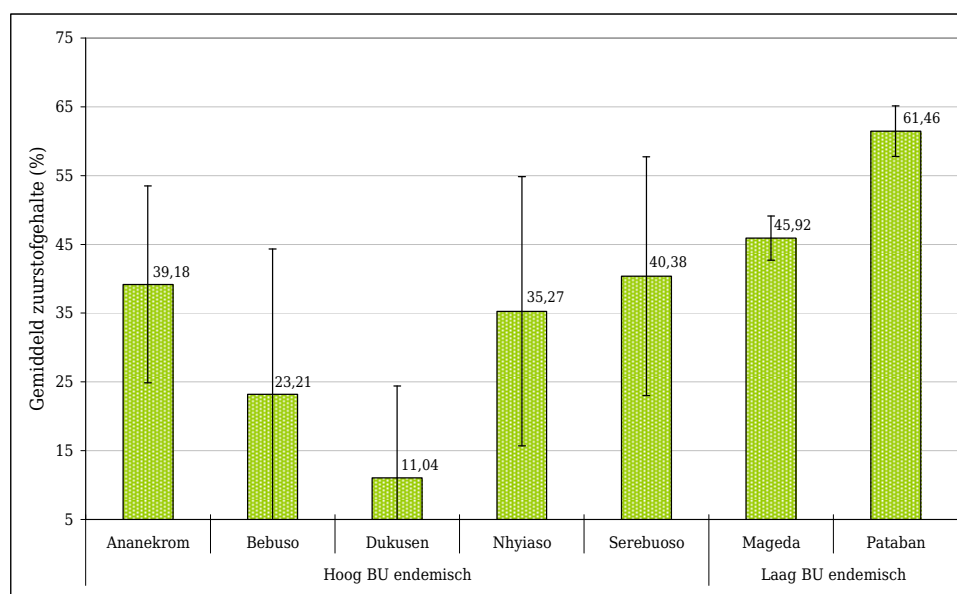
1.3. Temperatuur

Waterlichamen uit laag BU endemische gebieden waren gemiddeld 2,1°C kouder waren dan deze uit hoog BU endemische gebieden ($p = 0.01$, $\chi^2_1 = 6.49$) (Figuur 4).

Watertemperatuur verschilde over het algemeen niet significant tussen waterlichamen (geschat effect: 20.32; 95% BI: -13.6 tot 71.15). De temperatuur binnen de waterlichamen was blijkbaar uniform, want deze verschilt niet tussen water, biofilms en detritus ($p = 0.17$, $\chi^2_3 = 4.99$) (Tabel 6).

Tabel 4. Gemiddelde zuurstofverzadiging (%) met standaarddeviatie van het water rond de verschillende bemonsterde habitats in hoog en laag BU endemische dorpen. n=steekproefgrootte. Significante verschillen zijn aangeduid met een "a" en **: 0.01 < p < 0.001

	Hoog BU endemische dorpen (n)	Laag BU endemische dorpen (n)	Totaal (n)
Water (n)	46,43 +/- 19,47 (11)	56,40 +/- 8,20 (2)	47,97 +/- 18,32 (13) ^{a**}
Biofilm op kruiden (n)	32,79 +/- 20,66 (35)	55,16 +/- 9,15 (10)	37,76 +/- 20,86 (45)
Biofilm op hout (n)	30,50 +/- 18,80 (35)	54,32 +/- 8,32 (10)	35,80 +/- 19,68 (45)
Detritus (n)	24,38 +/- 19,81 (35)	51,06 +/- 9,04 (10)	30,31 +/- 21,12 (45) ^{a**}
Totaal (n)	30,86 +/- 20,41 (116)	53,69 +/- 8,59 (32)	35,79 +/- 20,75 (148)



Figuur 3. Het zuurstofgehalte verschilt significant tussen waterlichamen (gemiddeld effect van - 3.2, 95% BI: -4,7, -1,8). De bemonsterde dorpen worden beschouwd als een steekproef uit alle mogelijke dorpen. De waterlichamen van laag BU endemische dorpen hebben gemiddeld het hoogste zuurstofgehalte, maar dit verschilde niet significant met het hoog BU endemisch gebied. Foutenvlaggen representeren de standaarddeviatie per dorp.

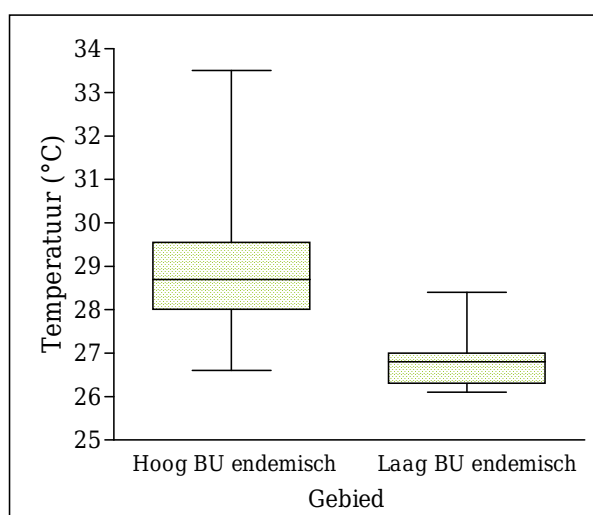
Tabel 5. Gemiddelde pH met standaarddeviatie van het water rond de verschillende bemonsterde habitats in hoog en laag BU endemische dorpen. Er waren geen significante verschillen.

n=steekproefgrootte.

	Hoog BU endemische dorpen (n)	Laag BU endemische dorpen (n)	Totaal (n)
Water (n)	6,10 +/- 0,88 (11)	6,17 +/- 0,12 (2)	6,11 +/- 0,80 (13)
Biofilm op kruiden (n)	6,23 +/- 0,64 (35)	6,08 +/- 0,07 (10)	6,20 +/- 0,57 (45)
Biofilm op hout (n)	6,19 +/- 0,72 (35)	6,07 +/- 0,07 (10)	6,17 +/- 0,63 (45)
Detritus (n)	6,31 +/- 0,61 (35)	6,04 +/- 0,07 (10)	6,25 +/- 0,55 (45)
Totaal (n)	6,23 +/- 0,67 (116)	6,07 +/- 0,01 (32)	6,20 +/- 0,60 (148)

Tabel 6. Gemiddelde temperatuur van het water rond de verschillende bemonsterde habitats in hoog en laag BU endemische dorpen. n=steekproefgrootte. Significante verschillen zijn aangeduid met "a" en **: 0.01 < p < 0.001.

	Hoog BU endemische dorpen (n)	Laag BU endemische dorpen (n)	Totaal (n)
Water (n)	28,72 +/- 1,66 (11)	27,15 +/- 1,34 (2)	28,48 +/- 1,61 (13)
Biofilm op kruiden (n)	28,83 +/- 1,44 (35)	26,79 +/- 0,72 (10)	28,37 +/- 1,56 (45)
Biofilm op hout (n)	28,74 +/- 0,96 (35)	26,70 +/- 0,34 (10)	28,29 +/- 1,21 (45)
Detritus (n)	29,26 +/- 1,52 (35)	26,84 +/- 0,48 (10)	28,72 +/- 1,69 (45)
Totaal (n)	28,92 +/- 1,36 (116) ^{a**}	26,80 +/- 0,57 (32) ^{a**}	28,46 +/- 1,51 (148)



Figuur 4. De gemiddelde temperatuur van het water was significant lager in de bemonsterde laag BU endemische dorpen dan in de hoog BU endemische dorpen ($p < 0,001$, $\chi^2_1 = 11,34$). Deze boxplots representeren de mediaan (horizontale streep), het eerste kwantiel en het derde kwantiel (grenzen van de rechthoeken), het minimum (onderste foutenvlag) en het maximum (bovenste foutenvlag) van de waargenomen data.

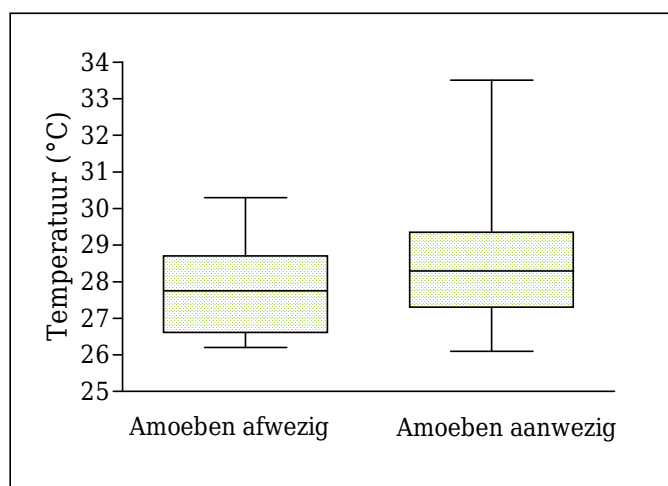
2. Distributie van amoeben

Amoeben werden geïsoleerd uit 134 van de 148 stalen (90,5%) (Tabel 7). In totaal werden echter 181 amoebenculturen gemaakt, vermits bij sommige stalen morfologisch verschillende amoeben onderscheiden werden die we verdeelden over verschillende agarplaten.

De isolatiefrequentie van amoeben verschilde niet tussen waterlichamen (geschat effect: 0.03; 95% BI: -0.19 tot 0.24), noch tussen de laag of hoog BU endemische gebieden die we bezochten ($p=0.10$, $\chi^2_1=2.70$). Er was geen significant effect van de habitats die we bemonsterden op de isolatiefrequentie van amoeben ($p=0.13$, $\chi^2_3=5.65$). De zuurstofverzadiging en de pH van het water hadden eveneens geen significant effect op de verspreiding van amoeben in het bemonsterde gebied (respectievelijk $p=0.60$, $\chi^2_1=0.27$; $p=0.42$, $\chi^2_1=0.66$). Wel waren stalen waaruit amoeben werden geïsoleerd gemiddeld warmer dan stalen waaruit dit niet kon ($p=0.02$, $\chi^2_1=5.43$) (Figuur 5). Zo konden we bij stalen met een temperatuur boven de 30°C in 20 van de 21 keer amoeben isoleren (95,2%) terwijl bij stalen met een temperatuur onder 30 °C we in 115 van de 128 gevallen amoeben isoleren (90%).

Tabel 7. Aantal stalen waaruit amoeben zijn geïsoleerd t.o.v. totaal aantal stalen voor de verschillende bemonsterde habitats in hoog en laag BU endemische dorpen. Er waren geen significante verschillen.

	Hoog BU endemische dorpen (%)	Laag BU endemische dorpen (%)	<i>Totaal (%)</i>
Water (%)	9/11 (81,8)	1/2 (50)	10/13 (76,9)
Biofilm op kruiden (%)	30/35 (85,6)	8/10 (80)	38/45 (84,4)
Biofilm op hout (%)	32/35 (91,4)	10/10 (100)	42/45 (93,3)
Detritus (%)	34/35 (97,1)	10/10 (100)	44/45 (97,8)
<i>Totaal (%)</i>	105/116 (90,5)	30/32 (93,8)	134/148 (90,5)



Figuur 5. De temperatuur van stalen waaruit amoeben zijn geïsoleerd was significant hoger dan de stalen waar geen amoeben uit gekweekt konden worden. Deze boxplots representeren de mediaan (horizontale streep), het eerste kwantiel en het derde kwantiel (grenzen van de rechthoeken), het minimum (onderste foutenvlag) en het maximum (bovenste foutenvlag) van de waargenomen data.

3. Distributie mycobacteriën

3.1. Verschillende testen vullen elkaar aan

De aanwezigheid van mycobacteriën werd op 5 verschillende manieren bepaald: (i) door rechtstreeks het DNA van het staal te extraheren en hierop PCR van het mycobacteriële 16S rRNA gen en (ii) real-time PCR van *IS2404* uit te voeren, (iii) door de stalen te cultiveren voor mycobacteriën (wat geverifieerd werd door microscopie en 16S rRNA-PCR) en (iv) door het DNA te extraheren uit de amoebenculturen en 16S rRNA-PCR en (v) real-time PCR van *IS2404* uit te voeren. Er waren twee stalen waarvan de mycobacteriële cultuur overgroeid was door schimmels en andere contaminanten en die niet positief waren voor één van de vier andere tests; deze werden uit deze distributieanalyse gehouden.

Mycobacteriën waren aanwezig in 136 van de 146 stalen (93,2 %). Door 16S rRNA-PCR uit te voeren op DNA rechtstreeks geëxtraheerd uit de stalen werden 127 stalen positief bevonden (85,5 %), d.m.v. mycobacteriële cultuur 70 stalen (54,3 %) (van mycobacteriën met een extracellulaire en/of intracellulaire oorsprong) en d.m.v. 16S rRNA-PCR op DNA-extracten van amoebenculturen 25 (18,1 %) (Tabel 8). Drie stalen en 7 amoebenculturen waren positief voor *IS2404* real-time PCR. Alleen de 16S rRNA-PCR testen op stalen en mycobacterie-en amoebenculturen waren in staat mycobacteriën te detecteren die door de andere tests waren gemist (Tabel 8), hoewel hoogstwaarschijnlijk met *IS2404* real-

time PCR andere soorten werden gedetecteerd dan bij de testen gebaseerd op het 16S rRNA gen.

Tabel 8. Het aandeel van elke test op de detectie van mycobacteriën

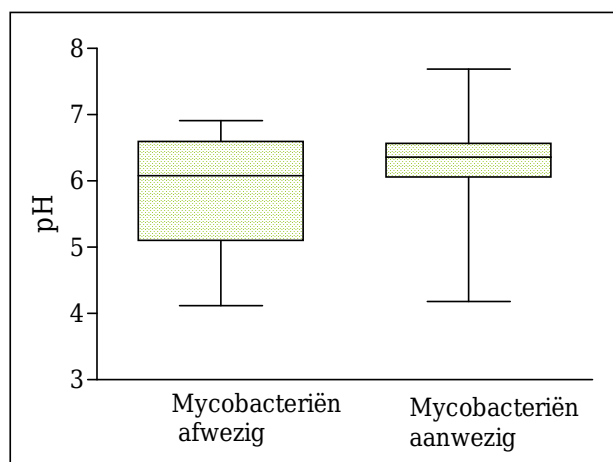
	Aantal stalen positief / totaal aantal stalen (%)	Aantal stalen enkel positief met deze test
16S rRNA-PCR op DNA extracten staal	127/148 (85,8)	53
Mycobacteriële cultuur	70/129 (54,3)	5
16S rRNA-PCR op DNA extracten amoebenculturen	25/138 (18,1)	4
IS2404 real-time PCR op DNA extracten staal	3/148 (2,0)	0
IS2404 real-time PCR op DNA extracten amoebenculturen	7/138 (5,1)	0

3.2. Bepalende factoren voor het voorkomen van mycobacteriën

De proportie stalen waarin mycobacteriën werden gedetecteerd verschilde niet significant tussen waterlichamen (geschat effect: -0.22; 0.95% BI: -0.70, 0.22), noch tussen de bezochte hoog en laag BU endemische gebieden ($p=0.99$, $\chi^2_1 < 0.001$) (Tabel 9). Er was geen significant effect van het type van habitat op de mycobacterieverspreiding ($p=0.06$, $\chi^2_3 = 7.38$). Het zuurstofgehalte ($p=0.32$, $\chi^2_1 = 0.97$) noch temperatuur ($p=0.18$, $\chi^2_1 = 1.79$) had een effect op hun verspreiding, maar de pH van het water bleek wel significant van belang te zijn ($p=0.03$, $\chi^2_1 = 4.64$). Stalen zonder mycobacteriën waren gemiddeld 0,4 eenheden zuurder dan stalen met mycobacteriën (5,82 +/- 0,90 vs. 6,23 +/- 0,56) (Figuur 6).

Tabel 9. Aantal stalen waarin mycobacteriën zijn gedetecteerd t.o.v. totaal aantal geanalyseerde stalen voor de verschillende bemonsterde habitats in hoog en laag BU endemische dorpen. Er waren geen significante verschillen.

	Hoog BU endemische dorpen (%)	Laag BU endemische dorpen (%)	Totaal (%)
Water (%)	10/11 (90,9)	2/2 (100)	12/13 (92,3)
Biofilm op kruiden (%)	31/35 (88,6)	8/9 (88,9)	39/44 (88,6)
Biofilm op hout (%)	31/34 (91,2)	9/10 (90,0)	40/44 (90,9)
Detritus (%)	35/35 (100)	10/10 (100)	45/45 (100)
Totaal (%)	107/115 (93,0)	29/31 (94,5)	136/146 (93,1)



Figuur 6. De pH van stalen waar mycobacteriën in gedetecteerd werden was significant hoger dan stalen waaring geen mycobacteriën aanwezig waren. Deze boxplots representeren de mediaan (horizontale streep), het eerste kwantiel en het derde kwantiel (grenzen van de rechthoeken), het minimum (onderste foutenvlag) en het maximum (bovenste foutenvlag) van de waargenomen data.

3.3. Vergelijking verspreidingspatroon mycobacteriën en amoeben

Het patroon van aan- of afwezigheid van mycobacteriën was niet significant verbonden met het patroon van aan- of afwezigheid van amoeben ($p=0.32$) (Tabel 10), m.a.w. de aanwezigheid van mycobacteriën was niet gecorreleerd met de aanwezigheid van amoeben en vice versa.

Tabel 10. Proportie van de stalen waar mycobacteriën en amoeben al dan niet samen in zijn gedetecteerd.

	Amoeben afwezig	Amoeben aanwezig
Mycobacteriën afwezig	2/146 (1,4 %)	8/146 (5,5 %)
Mycobacteriën aanwezig	11/146 (7,5 %)	125/146 (85,6 %)

3.4. Detectie van *M. ulcerans*

Het aantal keer dat IS2404, IS2606 en KR aanwezig waren in het geanalyseerde DNA extract werd berekend door de software verbonden aan de verschillende gebruikte real-time PCR toestellen. De basis hiervan bestaat uit de vergelijking van de Ct-waarden (moment waarop de amplificatie in de helft van zijn exponentieel verloop zit, weergegeven als cyclusnummer) van een ijklijn van extracten met gekende kopieaantallen van IS2404, IS2606 of KR met de Ct-waarden van het positieve staal. We geven hier kopieaantallen weer i.p.v. conventionele Ct waarden omdat we deze Ct-

waarden manueel moesten bepalen. De programma's slaagden er namelijk niet altijd in de achtergrondruis te verwerken wat resulteerde in onlogische drempelwaarde instellingen. Vermits we manueel deze drempelwaarde van één testbatch op dezelfde hoogte werd gesteld (aan de helft van het exponentieel verloop van elke amplificatie), is het mogelijk om Ct-waarden binnen batchen te vergelijken, bijvoorbeeld met de Ct-waarden van de ijklijn zodat het kopieaantal juist kan bepaald worden. Met manueel ingestelde drempels is het echter onzinnig om Ct-waarden te vergelijken tussen verschillende batchen, aldus de weergave van berekende kopieaantallen. Anderzijds moet men de kopietaantallen eerder beschouwen als grootte-orde en niet als exacte weergave van de realiteit.

In 3 van de 148 stalen (2,0 %) werd IS2404 gedetecteerd met real-time PCR. Slechts in één van deze stalen (BK-90079, een waterstaal uit een hoog BU endemisch gebied; Tabel 12) werd ook IS2606 en KR gedetecteerd (Tabel 11). De real-time PCR testen werden herhaald voor dit staal. De kopieaantallen van IS2404 verschilden redelijk sterk tussen de twee testherhalingen, vandaar de hoge standaarddeviatie. Gemiddeld gezien waren per μL extract (wat ongeveer overeenkomt met 5 mL van het oorspronkelijke waterstaal van 3 L) 17,6 kopieën van IS2404, 0,76 kopieën van IS2606 en 2,67 kopieën van KR aanwezig. In de twee andere stalen (één biofilmstaal van een kruid uit een hoog BU endemisch gebied en één biofilmstaal van hout uit een laag BU endemisch gebied; Tabel 12) was IS2404 aanwezig in respectievelijk 4,06 en 11,05 kopieën per μL extract, wat overeenkomt met ongeveer 300 μm biofilm op een kruidachtige plant en 300 μm^2 biofilm op een stuk hout.

Uit figuur 7 kan opgemaakt worden dat de temperatuur van de drie positieve stalen niet abnormaal is. De pH van het waterlichaam waar staal BK-90079 vandaan komt is over het algemeen lager dan de andere waterlichamen, hoewel er waterlichamen niet significant variëerden in hun pH gehalte (zie resultaten §1.2). Het zuurstofgehalte van het water, dat significant variëerde tussen waterlichamen en de bemonsterde habitats, van stalen BK-90079 en BK-90194 lagen eerder aan de hoge kant, terwijl het water rond staal BK-90099 een relatief gemiddelde waarde had.

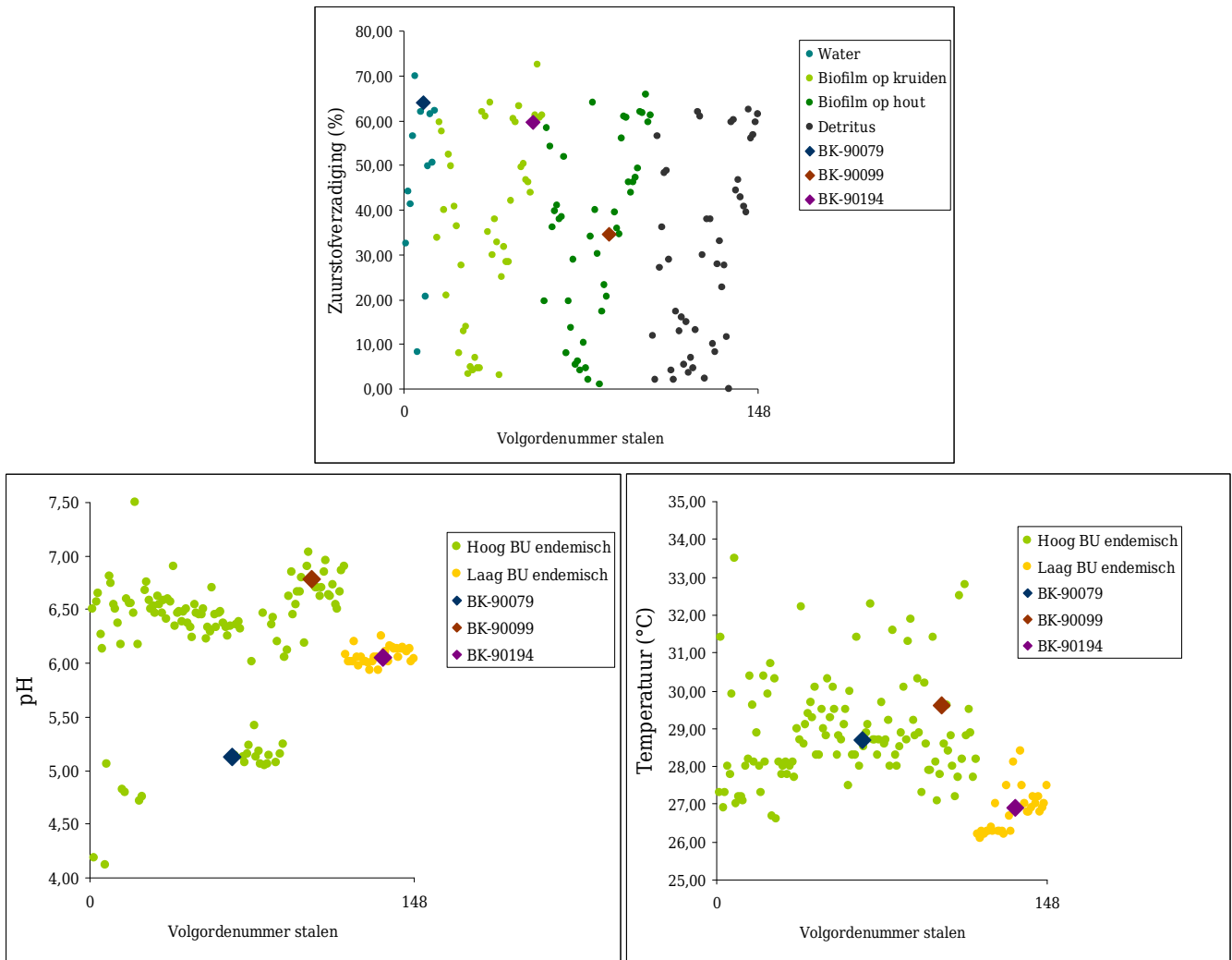
Tabel 11. Aantal kopiën van *IS2404*, *IS2606* en *KR* in de 3 *IS2404* positieve stalen.

Staalnummer	BK-90079	BK-90099	BK-90194
Aantal kopiën <i>IS2404</i> per μL extract	17,6 +/- 9,3	4,06	11,05
Aantal kopiën <i>IS2606</i> per μL extract	0,76 +/- 0,67	NG*	NG*
Aantal kopiën <i>KR</i> per μL extract	2,67 +/- 2,03	NG*	NG*

* NG: Niet gedetecteerd.

Tabel 12. Overzicht van de oorsprong en eigenschappen van de 3 ruwe stalen waarin *IS2404* werd gedetecteerd.

	Type van staal	Dorp van afkomst	Detectie andere mycobacteriën in zelfde staal?		Amoeben geïsoleerd uit zelfde staal?
BK-90079	Water	Nhyiaso (hoog BU endemisch)	Cultuur Negatief	16S rRNA-PCR positief	Nee
BK-90099	Biofilm op kruiden	Serebuoso (hoog BU endemisch)	Cultuur van intracellulaire mycobacteriën (<i>M. arupense</i>)		Ja
BK-90194	Biofilm op hout	Pataban (laag BU endemisch)	Cultuur van intracellulaire mycobacteriën (<i>M. fortuitum</i> verwante en <i>M. terrae</i> verwante)		Ja

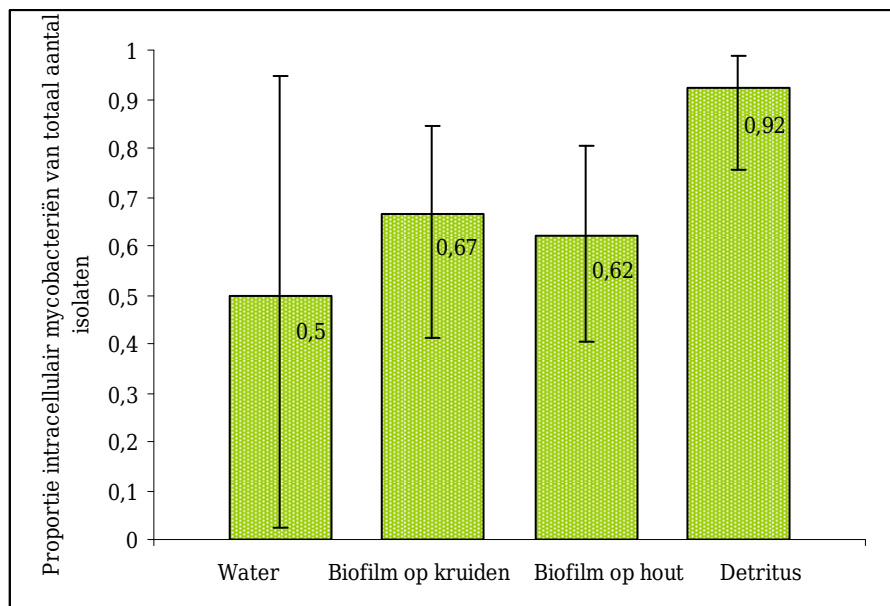


Figuur 7. Zuurstofverzadiging, pH en temperatuur van de stalen met IS2404 positieve mycobacteriën t.o.v. de waardes van de andere stalen.

3.5. Mycobacteriën intracellulair in micro-organismen

Uit 70 van 131 stalen (53,4 %) konden we mycobacteriën kweken; bij 19 stalen was ofwel zowel de kweek van intra-als extracellulaire mycobacteriën onherroepelijk gecontamineerd ofwel één van de twee zonder dat de tegenhanger van hetzelfde staal groei vertoonde. Uit 14 verschillende stalen (11,3 %) isoleerden we intracellulaire mycobacteriën en geen extracellulaire, uit 33 stalen (25,2 %) zowel intra-als extracellulaire mycobacteriën en uit 18 stalen (14,1 %) enkel extracellulaire mycobacteriën (Tabel 13). Uit 3 stalen isoleerden we intracellulaire mycobacteriën maar was de cultuur van extracellulaire mycobacteriën onherroepelijk gecontamineerd; de omgekeerde situatie deed zich eveneens voor bij 3 andere stalen. Er werd rekening gehouden met deze gecontamineerde culturen in de analyses.

We testten of de proportie van isolaten met intracellulaire mycobacteriën verschilt tussen de verschillende bemonsterde habitats en waterlichamen. Deze proportie bepalen we als de ratio van het aantal stalen met intracellulaire mycobacteriën over het totaal aantal stalen dat mycobacteriële groei vertoonden (van intracellulaire of extracellulaire mycobacteriën, of beide). Het relatief voorkomen van intracellulaire mycobacteriën verschilde niet tussen waterlichamen (geschat effect: -0.22; 95% BI: -0.67 tot 0.21) en werd niet beïnvloed door de BU endemiciteit van het bemonsterde gebied ($p=0.55$, $\chi^2_1=0.36$). Habittatype had een significant effect op het aandeel isolaten met een intracellulaire oorsprong ($p=0.045$; $\chi^2_3=8.04$) (Figuur 8): in detritusstalen kwamen mycobacteriën vaker intracellulair voor dan in stalen van biofilms op kruiden ($p=0.048$) en dan stalen van biofilms op hout ($p=0.03$). Er was geen significant verschil tussen detritusstalen en waterstalen ($p=0.21$) (Tabel 13).



Figuur 8. De proportie stalen met intracellulaire mycobacteriën t.o.v. het totaal stalen waaruit mycobacteriën zijn gekweekt (intracellulair of extracellulair) verschilde significant tussen habitats. Foutenvlaggen representeren het 95% BI berekend met de methode van Sterne.

Tabel 13. Aantal stalen met geïsoleerde intracellulaire mycobacteriën en extracellulaire mycobacteriën; het totaal aantal verschillende stalen waaruit ofwel intra- ofwel extracellulaire mycobacteriën uit zijn geïsoleerd; en de proportie intracellulaire isolaten t.o.v. het totaal aantal stalen waaruit mycobacteriën zijn gekweekt (intra-of extracellulair). Significante verschillen zijn aangeduid met een a of b en * : 0.05 < p < 0.01.

Hoog BU endemische dorpen				
	Intracellulair (%)	Extracellulair (%)	Intra-of extracellulair (%)	Intracellulair / intra- of extracellulair
Water	1/10 (10)	2/10 (20,0)	2/10 (20,0)	0,5
Biofilm op kruiden	7/35 (20)	11/35 (31,4)	11/35 (31,4)	0,64
Biofilm op hout	10/34 (29,4)	12/31 (38,7)	15/32 (46,9)	0,67
Detritus	19/29 (65,6)	13/23 (56,6)	22/25 (88,0)	0,95
<i>Totaal</i>	37/108 (34,3)	38/99 (38,4)	50/102 (49,0)	0,74
Laag BU endemische dorpen				
	Intracellulair (%)	Extracellulair (%)	Intra- of extracellulair (%)	Intracellulair / intra- of extracellulair
Water	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	0
Biofilm op kruiden	5/9 (55,6)	4/9 (44,4)	7/9 (77,8)	0,74
Biofilm op hout	3/10 (30,0)	5/9 (55,6)	6/9 (66,7)	0,62
Detritus	5/8 (62,5)	6/9 (66,7)	7/9 (77,8)	0,71
<i>Totaal</i>	13/29 (44,8)	15/29 (51,7)	20/29 (69,0)	0,65

<i>(Vervolg)</i> Totale waarden per habitat				
	Intracellulair (%)	Extracellulair (%)	Intra- of extracellulair (%)	Intracellulair / intra- of extracellulair
Water	1/12 (8,3)	2/12 (16,7)	2/12 (16,7)	0,5
Biofilm op kruiden	12/44 (27,3)	15/44 (34,1)	18/44 (40,1)	0,67 ^{a*}
Biofilm op hout	13/44 (30,0)	17/40 (42,5)	21/41 (51,2)	0,62 ^{b*}
Detritus	24/37 (64,9)	19/32 (59,3)	29/34 (85,3)	0,92 ^{a*, b*}
<i>Totaal</i>	<i>50/137 (36,5)</i>	<i>53/128 (41,4%)</i>	<i>70/131 (53,4)</i>	<i>0,75</i>

3.6. Mycobacteriële diversiteit

Na sequencing van enkele mycobacteriële 16S amplicons verkregen na PCR van DNA rechtstreeks geëxtraheerd uit de stalen was het duidelijk dat deze verschillende soorten van mycobacteriën bevatten, waardoor interpretatie van de sequenties niet mogelijk was. Hetzelfde probleem deed zich voor bij mycobacteriën geassocieerd met amoebenculturen. De identificatie van soorten kon alleen uitgevoerd worden op de culturen, vermits deze meestal slechts één of enkele soorten bevatten.

Niet alle 103 mycobacterieculturen (afkomstig van 70 verschillende stalen) konden echter geïdentificeerd worden op soortniveau. Van 19 culturen waren de kolonies pas zichtbaar na het vertrek uit Ghana, en de soortidentificatie is tot op heden nog niet uitgevoerd door de Ghanese medewerkers. In België werden 86 meegebrachte culturen (afkomstig van 61 verschillende stalen) gezuiverd door decontaminatie en herhaaldelijke subcultivaties. Een totaal van 21 vertoonden in België geen groei meer, maar vóór het transport was het DNA geëxtraheerd van de culturen gegroeid in Ghana zodat hier alsnog het 16S gen geamplificeerd en gesequenced kon worden. Bij 2 van deze 21 extracten was 16S rRNA-PCR negatief, zodat deze stalen niet gesequenced werden. Uiteindelijk werd van 85 culturen afkomstig uit 61 verschillende stalen de 16S amplicons gesequenced. Hierdoor bleken 13 mycobacterieculturen te bestaan uit een mengeling van verschillende soorten; bij 6 hiervan was de interpretatie van de sequentie hierdoor onmogelijk. Van 15 culturen kwam de 16S sequentie niet overeen met een gekende sequentie, maar het was wel mogelijk een soort aan te duiden waarmee ze de meeste

sequentiegelijkenis vertoonden. Een overzicht van alle geïdentificeerde geïsoleerde mycobacteriën wordt gegeven in tabel 4.

Tabel 14. Geïdentificeerde mycobacteriën

Soort (# stalen uit geïsoleerd)	Plaats	Type staal	Intracellulair	
<i>M. arupense</i> (27)	25 uit hoog endemische sites	1 uit water	1	
		6 uit biofilm op kruiden	2	
		8 uit biofilm op hout	3	
		10 uit detritus	8	
	3 uit laag endemische sites	0 uit water	0	
		1 uit biofilm op kruiden	1	
		0 uit biofilm op hout	0	
		2 uit detritus	1	
	Totaal aantal intracellulair			16
	Onbeschreven soort(en), maar nauw verwant aan <i>M. arupense</i> (6)	4 uit hoog endemische sites	0 uit water	0
1 uit biofilm op kruiden			1	
3 uit biofilm op hout			2	
0 uit detritus			0	
2 uit laag endemische sites		0 uit water	0	
		1 uit biofilm op kruiden	0	
		1 uit biofilm op hout	0	
		2 uit detritus	1	
Totaal aantal intracellulair			4	
<i>M. fortuitum</i> (7)		5 uit hoog endemische sites	0 uit water	0
	0 uit biofilm op kruiden		0	
	2 uit biofilm op hout		2	
	3 uit detritus		1	
	2 uit laag endemische sites	0 uit water	0	
		1 uit biofilm op kruiden	0	
		1 uit biofilm op hout	1	
		0 uit detritus	0	
Totaal aantal intracellulair			4	
<i>M. gordonae</i> (2)	2 uit hoog endemische sites	0 uit water	0	
		1 uit biofilm op kruiden	0	
		1 uit biofilm op hout	1	
		0 uit detritus	0	
	0 uit laag endemische sites			
	Totaal aantal intracellulair			1

Vervolg **Tabel 14.** Geïdentificeerde mycobacteriën

Soort (# stalen uit geïsoleerd)	Plaats	Type staal	Intracellulair	
<i>M. peregrinum</i> of <i>M. septicum</i> * (10)	6 uit hoog endemische sites	0 uit water	0	
		1 uit biofilm op kruiden	1	
		0 uit biofilm op hout	0	
		5 uit detritus	3	
	4 uit laag endemische sites	0 uit water	0	
		1 uit biofilm op kruiden	0	
		0 uit biofilm op hout		
		3 uit detritus	2	
	Totaal aantal intracellulair			6
	Onbeschreven soort(en), maar nauw verwant aan <i>M. terrae</i> (4)	1 uit hoog endemische sites	0 uit water	0
0 uit biofilm op kruiden			0	
0 uit biofilm op hout			0	
1 uit detritus			1	
3 uit laag endemische sites		0 uit water	0	
		0 uit biofilm op kruiden	0	
		1 uit biofilm op hout	0	
		2 uit detritus	0	
Totaal aantal intracellulair			1	
<i>M. porcinum</i> (1)		1 uit hoog endemische site	0 uit water	0
	0 uit biofilm op kruiden		0	
	1 uit biofilm op hout		0	
	0 uit detritus		0	
	0 uit laag endemische sites			
	Totaal aantal intracellulair			0
Onbeschreven soort, maar nauw verwant met <i>M. scrofulaceum</i> (1)	1 uit hoog endemische site	0 uit water	0	
		1 uit biofilm op kruiden	0	
		0 uit biofilm op hout	0	
		0 uit detritus	0	
	0 uit laag endemische sites			
	Totaal aantal intracellulair			0

* *M. peregrinum* en *M. septicum* zijn nauw verwant aan elkaar (Schinsky et al., 2000).

4. Mycobacteriën geassocieerd met amoebenculturen

4.1. Detectie van het mycobacteriëel 16S gen

Vijftien van de 181 amoebenculturen die gekweekt waren in Ghana (afkomstig van 10 van 134 verschillende stalen) groeiden niet meer in België, waardoor bij hen geen DNA-extractie en vervolgens 16S rRNA-PCR en IS2404 real-time PCR is uitgevoerd.

In DNA-extracten van 29 van de 166 amoebenculturen (17,5 %), afkomstig uit 25 van 124 verschillende stalen (20,2 %) werd mycobacteriëel DNA gedetecteerd op basis van PCR

van het mycobacteriëel 16S rRNA gen. 13 hiervan konden bevestigd worden door microscopie. Via deze amoebenculturen werden mycobacteriën gedetecteerd in 4 stalen die negatief waren voor mycobacteriële cultuur en 16S rRNA-PCR uitgevoerd op DNA extracten van ruwe stalen (Tabel 8).

Onder de microscoop werden geen mycobacteriën intracellulair in de amoeben geobserveerd, maar vermits de wand van de meeste types van amoebencysten ook paars kleurde door carbolfuchsine zou het in die gevallen niet mogelijk geweest zijn om intracellulaire mycobacteriën te onderscheiden. Er werden 1 tot 100 zuur-vaste staven gedetecteerd per 100 velden. Dit komt ruwweg overeen met een grootte-orde van 10^3 tot 10^5 mycobacteriebacillen per amoebencultuur.

Bij 3 stalen waren alle onderscheiden morfotypes van amoeben positief voor het mycobacteriëel 16S rRNA gen, bij 7 stalen werden slechts bij 1 van de 2 of 3 verschillende amoëoïde morfotypes mycobacteriën gedetecteerd. Identificatie van de verschillende morfotypes d.m.v. PCR werd echter niet uitgevoerd.

4.2. Detectie van IS2404

Zeven amoebenculturen testten positief voor de mycobacteriële sequentie IS2404. Geen van deze waren afkomstig van stalen die daarvoor al IS2404 positief bevonden waren na rechtstreekse DNA-extractie. De IS2404 kopieaantallen aanwezig in 1 μ L van de verschillende extracten worden weergegeven in tabel 15. IS2404 real-time PCR van deze positieve amoebenculturen werd 3 keer herhaald, maar slechts bij 1 staal werd IS2404 een tweede keer gedetecteerd. Bij de derde herhaling was ook dit staal negatief.

In 1 van deze 7 IS2404 positieve amoebenculturen werd ook IS2606 gedetecteerd. Het verloop van de amplificatie was echter abnormaal en niet-exponentieel, zodat kwantificatie van het kopieaantal niet kon uitgevoerd worden. De positieve extractie controle van dezelfde test-batch vertoonde echter een gelijkaardig abnormaal signaal, waardoor we deze amoebencultuur toch als IS2606 positief beschouwen (zie bijlage 2). De IS2404 positieve amoebenculturen werden geïsoleerd uit verschillende dorpen, zowel hoog als laag BU endemisch. Vier van de amoebenculturen waren geïsoleerd uit detritus, 2 uit biofilms op kruiden en 1 uit biofilm op hout (Tabel 5).

Tabel 15. Aantal kopieën van *IS2404*, *IS 2606* en *KR* in de 3 *IS2404* positieve amoebenculturen.

Staalnummer (morfotypenummer)	BK90060 (A)	BK90069 (C)	BK90098	BK90108 (B)	BK90144	BK90173	BK90199
Aantal kopieën <i>IS2404</i> per μ L extract	2,60	497,13	9,97	2,60	3,14	4,34	2,60
Aantal kopieën <i>IS2404</i> per μ L extract bij herhaling	NG*	NG*	0,13	NG*	NG*	NG*	NG*
Aantal kopieën <i>IS2606</i> per μ L extract	NG*	NG*	NG*	NG*	NG*	+	NG*
Aantal kopieën <i>KR</i> per μ L extract	NG*	NG*	NG*	NG*	NG*	NG*	NG*

* NG: Niet gedeteceerd

Tabel 16. Overzicht van de oorsprong en eigenschappen van de stalen waaruit de *IS2404* positieve amoeben werden geïsoleerd.

Staalnummer (morfotype nummer)	Type van staal	Dorp van afkomst	Detectie andere mycobacteriën in zelfde staal	
BK90060 (A)	Biofilm op kruiden	Ananekrom (Hoog BU endemisch)	Cultuur van intracellulaire mycobacteriën (<i>M.</i> <i>arupense</i>)	16S rRNA-PCR positief
BK90069 (C)	Detritus	Ananekrom (Hoog BU endemisch)	Cultuur gecontamineerd	16S rRNA-PCR negatief
BK90098	Detritus	Dukusen (Hoog BU endemisch)	Cultuur van intracellulaire mycobacteriën (<i>M.</i> <i>arupense</i>)	16S rRNA-PCR positief
BK90108 (B)	Biofilm op kruiden	Serebuoso (Hoog BU endemisch)	Cultuur negatief	16S rRNA-PCR positief
BK90144	Biofilm op hout	Nhyiaso (Hoog BU endemisch)	Cultuur negatief	16S rRNA-PCR positief
BK90173	Detritus	Mageda (Laag BU endemisch)	Cultuur negatief	16S rRNA-PCR positief
BK90199	Detritus	Pataban (Laag BU endemisch)	Cultuur van enkel extracellulaire mycobacteriën (<i>M.</i> <i>perigrinum</i> of <i>septicum</i>)	16S rRNA-PCR positief

4.3. Distributie mycobacterie-positieve geïsoleerde amoeben

Er was geen verschil in percentage mycobacterie-positieve geïsoleerde amoeben (gedetecteerd met 16S rRNA-PCR en IS2404 PCR) tussen hoog endemische en laag endemische gebieden ($p=0.39$, $\chi^2_1=0.92$) (Tabel 17) of tussen waterlichamen in het algemeen (geschat effect: -0.13; 95% BI: -0.36 tot 0.11). Het type van habitat had geen significant effect ($p=0.62$, $\chi^2_3=1.80$) (Tabel 17), noch was er een effect van O₂ ($p=0.53$, $\chi^2_1=0.46$), pH ($p=0.64$, $\chi^2_1=0.21$) of temperatuur ($p=0.22$, $\chi^2_1=0.64$).

Stalen waar geen amoeben uit werden geïsoleerd en stalen waar de amoebenculturen niet groeiden in België werden niet opgenomen in deze analyse.

Tabel 17. Aantal stalen waaruit amoeben zijn geïsoleerd die positief testten voor mycobacteriën (d.m.v. 16S rRNA-PCR of IS2404 real-time PCR). Er waren geen significante verschillen tussen habitats en hoog of laag BU endemische dorpen.

	Hoog BU endemische dorpen (%)	Laag BU endemische dorpen (%)	<i>Totaal (%)</i>
Water (%)	3/9 (33,3)	0/1 (0)	3/10 (30,0)
Biofilm op kruiden (%)	8/24 (25,8)	1/7 (12,5)	8/31 (25,8)
Biofilm op hout (%)	5/30 (15,6)	1/10 (10,0)	6/40 (15,0)
Detritus (%)	9/33 (26,4)	2/10 (20,0)	11/43 (25,6)
<i>Totaal (%)</i>	25/96 (23,6)	4/28 (13,8)	29/124 (23,4)

IV. Discussie

Experimenteel kan aangetoond worden dat de meeste mycobacteriën, inclusief *M. ulcerans*, intracellulair in amoeben kunnen overleven (Krishna-Pasad en Gupta 1978; Adékambi et al., 2006; Eddyani et al., in voorbereiding) en dat dit intracellulaire verblijf kan selecteren voor virulentere fenotypes en genotypes (Cirillo et al., 1997; Eddyani et al., in voorbereiding). In deze studie onderzochten we of mycobacteriën ook in de natuur een intracellulaire levenswijze in amoeben kennen, in de hoop een nieuw omgevingsreservoir voor *M. ulcerans* te identificeren.

1. Ecologie van mycobacteriën in aquatische ecosystemen in Ghana

1.1. Mycobacteriën komen wijdverspreid voor

Door de resultaten van 5 verschillende analyses samen te voegen konden we constateren dat mycobacteriën in 136 van de 146 stalen (93,1%) aanwezig waren. De eerste conclusie is dus dat mycobacteriën zeer ubiquist zijn in de aquatische ecosystemen die we bemonsterden.

In tegenstelling tot wat Eddyani et al. (2008) vonden in Benin, detecteerden we statistisch gezien even vaak mycobacteriën in hoog dan in laag BU endemische gebieden. Bovendien was er geen verschil in de detectiefrequentie van mycobacteriën tussen waterlichamen en de verschillende bemonsterde habitats. Zuurstofgehalte en temperatuur hadden geen significant effect, maar stalen met mycobacteriën waren gemiddeld 0,4 eenheden basischer dan stalen zonder, met een gemiddelde pH respectievelijk van $6,22 \pm 0,90$ en $5,82 \pm 0,56$. In eerdere studies in Europa en de VSA vond men nochtans een sterke correlatie tussen mycobacterie-aantallen en een zuurder pH-gehalte van bodems en water (Iiavanainen et al., 1993 en 1999; Kirschner et al., 1992; Brooks et al., 1984). Wij keken niet naar aantallen mycobacteriën, omdat dit alleen kon bepaald worden met mycobacteriële cultuur, en zo een heel aantal positieve stalen zouden negeren. Het was bovendien in veel gevallen niet mogelijk om de kolonievormende eenheden te tellen wegens contaminaties. Door geen aantallen te analyseren kan het correlatiepatroon tussen mycobacteriedistributie met pH dus afwijken van de realiteit. Anderzijds groeien de meeste snelgroeende mycobacteriën beter op iets basischere bodems (Portaels en Pattyn, 1982).

Uit figuur 6 kan bovendien opgemaakt worden dat het effect van pH op de detectie van mycobacteriën niet heel sterk is.

We besluiten dat behalve de zuurtegraad van het water we geen factor konden identificeren die de verspreiding van mycobacteriën in dit Ghanees studiegebied beïnvloedt.

1.2. Diversiteit mycobacteriën: soortidentificatie van gekweekte stammen

M. arupense werd het meest frequent geïsoleerd, namelijk in 28 verschillende stalen. Het is een recent geïdentificeerde soort, ontdekt in klinische stalen uit de VSA (Cloud et al., 2006). Deze soort werd voorts gedetecteerd in water en ratten in Benin en Tanzania (Eddyani et al., 2008, Durnez et al., 2008), maar niet in de hoge frequentie gezien in deze studie. Bovendien isoleerden we uit 6 stalen onbeschreven stammen die nauw verwant zijn aan *M. arupense*. *M. arupense* behoort tot het *M. terrae*-complex, hiervan isoleerden we eveneens onbeschreven soorten in 4 stalen die nauw verwant zouden zijn aan *M. terrae*.

M. fortuitum is een welgekende pathogene opportunistische omgevingsmycobacterie (Portaels et al., 1995; Falkinham, 2002), en werd geïsoleerd uit 7 verschillende stalen. *M. septicum* en/of *M. peregrinum* (nauw verwante soorten die we niet van elkaar konden onderscheiden) behoren eveneens tot het *M. fortuitum* complex en werden geïsoleerd uit 10 verschillende stalen. Ook bij een mycobacteriose uitbraak in laboratoriumzebravissen was een niet te onderscheiden (moleculair noch biochemisch) *M. septicum* en/of *M. peregrinum* groep gecultiveerd (Kent et al., 2004). Beide werden reeds eerder geïsoleerd uit verscheidene dieren (inclusief de mens) en water (Schinsky et al., 2000; Meunier et al., 2003; September et al., 2004; Thomas et al., 2008).

M. gordonae is meestal een saprofytische bodemmycobacterie maar kan ook infecties bij mensen veroorzaken (Portaels et al., 1995; Weyers et al., 1996). Wij isoleerden het uit 2 biofilmstalen.

M. porcinum isoleerden we uit 1 staal. Deze werd voor het eerst geïsoleerd uit varkens (Tsakamura et al., 1983) en kan voorts infecties veroorzaken bij mensen en andere dieren (Schinsky et al., 2004), en werd eveneens gedetecteerd in water (Fraser et al., 1999).

Ten slotte isoleerden we een onbeschreven soort die nauw verwant is aan *M. scrofulaceum*, eveneens een gekende pathogene opportunistische omgevingsmycobacterie (Falkinham, 2002).

1.3. Mycobacteriën kennen naast een vrijlevende ook een intracellulaire levenswijze

We kweekten mycobacteriën uit 70 verschillende stalen (53,4 %): 14 verschillende stalen (11,3 %) isoleerden we intracellulaire mycobacteriën en geen extracellulaire, uit 33

stalen (25,2 %) zowel intra-als extracellulaire mycobacteriën en uit 18 stalen (14,1 %) enkel extracellulaire mycobacteriën (Tabel 13). We stelden vast dat in 74,6 % van de stalen waaruit we mycobacteriën konden kweken intracellulaire mycobacteriën werden gedetecteerd. Alvorens dit interessant gegeven verder te bespreken, dient er echter nog een opmerking gemaakt worden over de gehanteerde methodologie. Het is namelijk niet helemaal zeker of tijdens de kweek van extracellulaire mycobacteriën ook geen eventuele intracellulaire soorten aanwezig waren, vermits niet van alle gebruikte decontaminatieproducten het effect gekend is op amoebencysten. Op het moment van decontaminatie verkeerden hoogstwaarschijnlijk alle amoeben in de cystenvorm, vermits de stalen toen al enkele dagen tot weken op 4°C werden bewaard. Eén van de decontaminatieproducten, NaOH, lyseert trofozoïeten (Brinley, 1929) maar cysten zijn hiertegen resistent (Goldschmit et al., 2008). Cycloheximide inhibeert wel de cystenvorming, maar is voor de rest niet toxisch voor de amoebe *Balamuthia mandrillaris* (Siddiqui et al., 2007). Amoebencysten zijn indrukwekkend resistent tegen een hele reeks van biocidebehandelingen, zoals chlorines, UV radiatie, hoge temperaturen en langdurige droogtes (Akzozek et al., 2002; McDonnell en Russell, 2007; Sriram et al., 2008), maar de invloed van oxaalzuur en malachietgroen werd bij ons weten nog niet onderzocht op amoebencysten. Het is dus mogelijk dat door de decontaminatieprocedure ook de cysten lyseerden en hun eventuele intracellulaire gasten zo vrijkwamen. Dit zou betekenen dat de culturen van extracellulaire mycobacteriën mogelijks zowel intra- als extracellulaire mycobacteriën representeren. Als dit waar is dan zouden normaal gezien voor alle stalen waaruit intracellulaire mycobacteriën gekweekt zijn ook culturen gegroeid moeten zijn met alle aanwezige mycobacteriën. Bij 14 stalen werden echter alleen intracellulaire mycobacteriën geïsoleerd, wat kan betekenen dat (1) amoebencysten wel resistent zijn aan de decontaminatieprocedure, of (2) de kans op een succesvolle kweek van mycobacteriën zeer variabel is en het product van confounding factoren. Als het laatste geval waar is dan heeft het feit dat uit 18 stalen enkel extracellulaire mycobacteriën werden geïsoleerd ook weinig betekenis vermits de kweek van de intracellulaire mycobacteriën ook gewoon mislukt zou kunnen zijn.

Hoe dan ook leek het ons wel zinvol om de ratio van het aantal stalen met intracellulaire mycobacteriën over het totale aantal stalen dat mycobacteriële groei vertoonden (van intracellulaire of extracellulaire mycobacteriën, of beide) te bepalen, en te analyseren of deze ratio verschilde naargelang de endemiciteit, het waterlichaam en het habitat. Uit deze analyse konden we de hypothese verwerpen dat er in BU endemische gebieden bepaalde condities zouden heersen die een intracellulaire levenswijze bevorderen.

Bovendien bleek geen enkele van de geïsoleerde mycobacteriesoorten die we identificeerden een voorkeur te hebben voor een intra-of extracellulaire levenswijze. Elke soort werd namelijk in meer dan de helft van de gevallen uit een intracellulaire bron geïsoleerd (zie tabel 14). Wel bleek in detritus mycobacteriën vaker intracellulair voor te komen dan in biofilms. Wij vonden dat detritus gemiddeld minder zuurstof bevatte dan de andere staaltypes; misschien zet deze conditie mycobacteriën aan om intracellulair in micro-organismen te leven.

Deze studie bevestigt eens te meer de *in vitro* experimenten waarbij mycobacteriën zonder problemen overleven in amoeben en hun cysten (Krishna en Pasad, 1976; Adékambi et al., 2006; Eddyani et al., in voorbereiding) en de verscheidene studies die amoebenresistente (myco)bacteriën vonden in natuurlijke en mensgemaakte watersystemen (Fritze et al., 1993; La Scola et al., 2001; Thomas et al., 2006a, 2006b en 2008; Eddyani et al., 2008; Evstigneena et al., 2009). Mycobacteriën zijn resistent aan vertering door amoeben en leven in natuurlijke omstandigheden vaak intracellulair in amoeben en eventueel in andere micro-organismen.

De verspreiding van amoeben was echter niet gecorreleerd met die van mycobacteriën. In ons studiegebied waren zowel amoeben als mycobacteriën echter dermate ubiquit dat een correlatie in hun verspreidingspatroon waarschijnlijk moeilijk te detecteren is.

1.4. Detectie van IS2404, IS2606 en KR

Vermits in de laatste jaren duidelijk is geworden dat IS2404, IS2606 en genen die instaan voor mycolactoneproductie (bv. KR) niet exclusief in *M. ulcerans* voorkomen is het nodig om eveneens het aantal repeats te kennen dat deze sequenties voorkomen in een DNA extract, vermits deze aantallen wel specifiek zijn voor *M. ulcerans*. Deze kwantificatie is mogelijk met de twee multiplex real-time PCR testen (Fyfe et al., 2007) die wij in deze studie gebruikten.

In 3 van de 148 stalen (2,0 %) detecteerden we IS2404 DNA: een waterstaal uit Nhyieso, een hoog BU endemisch dorp; een biofilmstaal op hout uit Serebuoso, eveneens een hoog BU endemisch dorp; en een biofilmstaal op een kruid uit Pataban, een laag BU endemisch dorp (Tabel). Enkel in het waterstaal werd ook IS2606 en KR gedetecteerd. Gemiddeld gezien waren hier per μL DNA-extract (wat ongeveer overeenkomt met 5 mL van het oorspronkelijke waterstaal van 3 L) 17,6 +/- 9,3 kopieën van IS2404, 0,76 +/- 0,67 kopieën van IS2606 en 2,67 +/- 2,03 kopieën van KR aanwezig. In *M. ulcerans* komt IS2404 echter ongeveer 2,1 keer meer voor dan IS2606 en ongeveer 13,3 keer meer dan

KR. Deze verhoudingen komen niet overeen met degene die wij vinden in dit waterstaal, maar anderzijds kan door de lage DNA concentraties de kwantificatie niet als exact beschouwd worden (wat gereflecteerd wordt in de hoge standaarddeviaties). Zo kunnen we niet uitsluiten noch bevestigen dat we *M. ulcerans* detecteerden.

Belangrijk is dat dit staal één van de weinige was waar geen amoeben uit geïsoleerd werden. Het voorkomen van amoeben is dus geen vereiste voor het voorkomen van deze IS2404 en IS606 bevattende MPM.

In de twee andere stalen was IS2404 aanwezig in respectievelijk 4,06 en 11,05 kopieën per μL extract, wat overeenkomt met ongeveer 300 μm biofilm op een kruidachtige plant en 170 μm^2 biofilm op een stuk hout. Als deze afkomstig zouden zijn van een *M. ulcerans* genoom dan zou IS2606 theoretisch in respectievelijk 1,9 en 5,2 kopieën moeten gedetecteerd worden en KR in respectievelijk 0,3 en 0,8 kopieën. Deze waarden liggen onder de detectielimieten vooropgesteld door de ontwerpers van de real-time PCR test (9 kopieën van IS2606; 1,5 tot 3 kopieën van KR) (Fyfe et al., 2007), hoewel wij bij positieve controles in staat waren om slechts 3 kopieën van IS2606 te detecteren en bij het positieve waterstaal gemiddeld slechts 0,76 kopieën. Ook bij deze twee stalen kunnen we dus niet uitsluiten, noch met zekerheid bevestigen, dat we *M. ulcerans* vonden.

1.5. Bespreking van de gebruikte methodes voor de detectie en identificatie van alle leden van *Mycobacterium*

Het uitvoeren van 16S rRNA-PCR op DNA geëxtraheerd uit ruwe stalen bleek de meest gevoelige methode voor de detectie van mycobacteriën (zie tabel 8), hoewel zo ook dode mycobacteriën worden gedetecteerd. Hiermee werden 85,8 % van de stalen mycobacterie-positief gevonden, in tegenstelling tot 54,3 % d.m.v. cultuur. Cultuur zou nochtans gevoeliger zijn dan 16S rRNA-PCR (Pfaller et al., 1994), wat waarschijnlijk de reden is dat toch 5 stalen cultuurpositief maar 16S rRNA-PCR-negatief waren. Het is weliswaar niet zo evident om mycobacteriën uit omgevingsstalen te kweken. Zowel de decontaminatiemethode als het gebruikte medium beïnvloedt namelijk het aantal en de soorten die geïsoleerd worden uit een omgevingsmonster (Brooks et al., 1984b; Portaels et al., 1988; Carson et al., 1988; Kamala et al., 1994; Iivanainen, 1995). In deze studie werd een decontaminatiemethode met 5% oxaalzuur gebruikt omdat deze zeer effectief contaminanten doodt, hetgeen nodig was voor het type van omgevingsstalen dat wij onderzochten (Portaels et al., 1984). Oxaalzuur, nog meer dan de andere courant gebruikte decontaminatieproducten, reduceert echter ook de overlevingskansen van vele mycobacteriën (Carson et al., 1988; Palomino en Portaels, 1998). Ondanks de hevige

decontaminatieprocedure waren 34 culturen (afkomstig van 24 verschillende stalen) toch onherroepelijk gecontamineerd zodat ze onbruikbaar waren voor analyse. LJ-bodems geënt met intracellulaire mycobacteriën (die een extra antibioticumbehandeling kregen) waren minder vaak gecontamineerd dan diegene geënt met extracellulaire mycobacteriën waren (14,9 % vs. 8,1 %), maar dit verschil konden we niet als significant beschouwen ($p=0.051$; $\chi^2_1=3.79$). Contaminatiekans verschilde ook niet tussen de bemonsterde waterlichamen (geschat effect: -0.15; 95%BI: -0.51, 0.22), maar wel tussen de types van stalen ($p<0.001$; $\chi^2_3=22.40$): LJ-bodems geënt met detritusstalen waren vaker gecontamineerd dan die geënt met één van de twee types van biofilmstalen (9,8 % van de culturen vs. 1,4 %, $p<0.001$).

Behalve het effect van decontaminatiemethode en medium vormen mycobacteriën onderling concurrenten voor elkaar op de LJ-bodems, waarbij voornamelijk de snelgroeiers het winnen van de traaggroeiers. Zo kwamen in onze culturen slechts 1 of enkele soorten voor, terwijl door sequencing van 16S rRNA-DNA amplicons van DNA afkomstig uit de ruwe stalen duidelijk was dat er veel meer verschillende soorten mycobacteriën in aanwezig waren. Daarenboven toont dit alles aan dat gekweekte mycobacteriën geen weergave zijn van de daadwerkelijke aanwezige mycobacteriën in de omgeving. Studies die zich enkel toeleggen op kweek van mycobacteriën onderschatten dus hun aanwezigheid en kunnen geen ecologisch relevante conclusies trekken (Dailloux et al., 1999). Vermits we in deze studie verschillende methodes hanteren, konden we wel het effect van verscheidene omgevingsfactoren op de verspreiding van mycobacteriën testen.

Ofschoon de moeilijkheden, levert mycobacteriële kweek informatie die 16S rRNA-PCR niet kan verstrekken. In deze studie kon ten eerste alleen met kweek specifiek intracellulaire mycobacteriën gekweekt worden, door het toevoegen van een antibioticum dat extracellulaire mycobacteriën doodt maar niet binnenin micro-organismen doordringt (Menashe et al., 2008; Eddyani et al., 2008). Ten tweede konden de mycobacteriën die geïsoleerd waren vaak geïdentificeerd worden (door sequencing van hun geamplificeerd 16S rRNA-DNA), waarschijnlijk juist omdat ze andere soorten verdrongen in hun kweek, die anders de interpretatie van de 16S rRNA sequentie zouden bemoeilijken. Niettemin isoleerden we zowel snelgroeïende als traaggroeïende mycobacteriën.

Bovendien is PCR-inhibitie een veel voorkomend probleem voor humusrijke omgevingsstalen door de aanwezigheid van fulvo- en humuszuren. Deze worden mee met het DNA geëxtraheerd worden en verhinderen de werking van het DNA-polymerase (Tsai

et al., 1992). Onze stalen bevatten inderdaad veel humus zodat zowel de conventionele PCR test als de real-time PCR testen frequent geïnhibeerd waren. In 66,6% van de gevallen was 16S rRNA-PCR geïnhibeerd. Deze stalen werden opnieuw geëxtraheerd met de PowerSoil - DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories). Het DNA werd hiermee effectief gezuiverd van inhibitoren, vermits PCR inhibitie bij geen enkele staal meer optrad. IS2404/IPC real-time PCR was in 24,3% van de gevallen geïnhibeerd. Dit lagere aantal in vergelijking met conventionele PCR zou o.a. verklaard kunnen worden door het feit dat bij onze real-time PCR tests het DNA extract 4% uitmaakte van het reactievolume, terwijl bij de conventionele PCR test deze 10% besloeg; percentages die zo goed als rechtevenredig zijn met de percentages geïnhibeerde stalen. Alle stalen die met real-time PCR geïnhibeerd waren vertoonden ook inhibitie met conventionele PCR. Met real-time PCR kon kwantitatief bepaald worden dat de extractie efficiëntie van de PowerSoil - DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories) tot 1000 keer lager was als de efficiëntie van de gemodificeerde methode van Boom. Vermits *M. ulcerans* slechts in lage concentraties voorkomt in de omgeving werden extracten van de PowerSoil - DNA Isolation Kit niet gebruikt voor de IS2404 real-time PCR test. Om inhibitie te verhelpen kon voor deze test echter een speciale real-time PCR reactiemix gebruikt worden (TaqMan® Environmental Mastermix), die effectief bleek te zijn vermits geen enkele reactie nog geïnhibeerd was.

2. Detectie van mycobacteriën door de kweek van amoeben

2.1. Amoeben komen wijdverspreid voor in aquatische ecosystemen van Ghana

We konden uit 90,5 % van de stalen amoeben isoleren, waardoor we concluderen dat amoeben een zeer ubiquiste groep zijn in het gebied dat we bestudeerden, zoals in de meeste gebieden het geval blijkt te zijn (Rodriguez-Zaragosa, 1994).

Behalve de temperatuur van het water konden we geen factor identificeren die een invloed zou hebben op de distributie van amoeben. Bij elke temperatuur die we observeerden konden amoeben geïsoleerd worden, maar de frequentie hiervan lag iets hoger bij hogere temperaturen (Figuur 5). Eddyani et al. (2008) isoleerden vaker amoeben in hoog dan in laag BU endemische gebieden uit veilige waterbronnen (bv. gepompt grondwater of regencollectoren). De isolatiefrequentie verschilde echter niet voor onveilige, natuurlijke waterbronnen, zoals ook wij konden vaststellen.

Identificatie op soort- of genusniveau van de amoeben viel helaas buiten het tijdsbestek van deze thesis. Deze resultaten zullen nog verduidelijken of de verschillende soorten en genera van amoeben die we isoleerden een gevarieerder verspreidingspatroon kennen.

2.2. Mycobacteriën geassocieerd met amoebenculturen

Bijna 18% van de amoebenculturen (afkomstig van 25 van 124 verschillende stalen [18,9%]) testte positief voor het mycobacteriëel 16S gen. Dertien van de 29 konden bevestigd worden door detectie van zuurvaste staven onder de microscoop.

De amoebenculturen werden herhaaldelijk gesubcultiveerd door kleine, zuivere delen van de plaat uit te snijden en op een verse plaat te enten, om ze te zuiveren van schimmels en andere contaminanten. Dit zorgde er echter voor dat de amoebenpopulatie van een staal veel verdund werd, wat impliceert dat (1) de gedetecteerde mycobacteriën in de amoebenculturen zich hier waarschijnlijk ook vermenigvuldigden en (2) dat we misschien een onderschatting maken van de werkelijke hoeveelheid stalen met amoeben waar mycobacteriën zich mee zouden associëren. Bovendien waren 4 van deze mycobacterie-positieve amoebenculturen afkomstig van stalen waar d.m.v. 16S rRNA-PCR of mycobacteriecultuur geen mycobacteriën in werden gedetecteerd; 2 hiervan konden bevestigd worden door microscopie. Dit toont opnieuw aan dat deze mycobacteriën meegroeien met de amoebenculturen, en dat amoebenkweek een gevoelige manier kan zijn om mycobacteriën te detecteren. Deze gevoeligheid zou misschien nog verhogen als het aantal subcultivaties voor zuivering gereduceerd zou kunnen worden, bijvoorbeeld door toevoeging van een schimmelspecifiek antibioticum. Wegens het snelle groeien van amoeben en schimmels werden besmette platen na 1 tot 3 dagen al gesubcultiveerd. Dit is voor veel mycobacteriën niet lang genoeg om uitvoerig te vermenigvuldigen, zodat ook hierdoor hun aantallen sterk verdund werden.

Door licht- en transmissie-elektronenmicroscopie (Fritze et al., 1993; Yu et al., 2007) en door 16S rRNA-PCR (Thomas et al., 2006, 2008) zijn al eerder bacteriën gevonden geassocieerd met amoeben geïsoleerd uit lenzenvloeistof en verscheidene omgevings-, klinische- en drinkwaterstalen. Veel van deze bacteriën konden na lysis van de amoeben niet verder gekweekt worden, waardoor men concludeerde dat ze als obligate endosymbionten of parasieten in de amoeben voorkwamen (Fritze et al., 1993; Thomas et al., 2008). Wij hebben helaas de 16S positieve amoebenculturen (nog) niet kunnen kweken voor mycobacteriën, vermits dit buiten het tijdsbestek van deze thesis viel.

Co-cultuur met axenisch gegroeide amoeben wordt door een Franse onderzoeksgroep frequent gebruikt om allerlei amoebenresistente bacteriën, inclusief mycobacteriën, succesvol te isoleren uit een waaijer van stalen (voor het eerst beschreven in La Scola et al., 2001). Op die manier konden ze bovendien veel nieuwe soorten beschrijven en werd voor enkele reeds gekende soorten ontdekt dat ze in staat zijn intracellulair in amoeben

te repliceren of ze te lysisen (Adékambi et al., 2004; Thomas et al., 2006a, 2006b en 2008; Pagnier et al., 2008; Evstigneeva et al., 2009). Vermits enkele van deze soorten mens-pathogenen waren, konden ze door deze techniek te hanteren nieuwe mogelijke transmissieroutes vanuit het water blootleggen.

2.3. Detectie van IS2404 in amoebenculturen

Verrassend genoeg testten 7 amoebenculturen positief voor IS2404. Geen van de stalen waar deze amoeben uit geïsoleerd werden behoorde tot de 3 IS2404 positieve ruwe stalen. De IS2404 mycobacteriën uit de amoebenculturen konden echter niet geïsoleerd worden op LJ bodems. Uit 1 extractie-batch was de negatieve extractie controle positief voor IS2404, maar uit deze batch waren geen andere stalen positief. Hoewel contaminatiegevaar nooit valt uit te sluiten, waren de negatieve controles van alle batchen waarin IS2404 positieve amoebenculturen werden geëxtraheerd wel degelijk negatief. In principe kunnen we dus concluderen dat ook mycobacteriën met IS2404, bvb. *M. ulcerans*, mee kunnen groeien met amoeben in een xenische cultuur en bovendien, door deze vermenigvuldiging, de detectiefrequentie van de bacteriën verhoogt. Dit is de eerste aanwijzing dat IS2404 bevattende mycobacteriën in de natuur met amoeben geassocieerd kunnen zijn. PCR-gebaseerde identificatie van de amoeben moet echter nog verhullen of enkel bepaalde amoebensoorten specifiek geassocieerd zijn met IS2404 bevattende mycobacteriën.

Bij 6 van de IS2404 positieve amoebenculturen zou deze sequentie aanwezig in 2,60 tot 9,97 kopieën per μL DNA-extract (tabel), waardoor de theoretisch berekende aantallen van IS2606 en KR (in het geval van *M. ulcerans*) onder de detectielimiet zouden liggen. Zo kan niet uitgesloten noch bevestigd worden of *M. ulcerans*, dan wel een andere IS2404 bevattende mycobacterie geassocieerd is met de amoeben. Toch werd bij één amoebencultuur (die 4,34 IS2404 kopieën per μL DNA extract bevatte) een vaag amplificatiesignaal opgevangen bij de test voor IS2606. Het fluorescentiesignaal verliep niet exponentieel in 'real-time', maar een gelijkaardige vorm werd waargenomen bij een positieve extractiecontrole (zie bijlage 1). Daarom vermoeden we dat het DNA extract wel degelijk IS2606 bevatte.

Bij één van de amoebenculturen werden 497,13 kopieën van IS2404 per μL DNA extract waargenomen, wat in het geval van *M. ulcerans* zou overeen komen met het DNA afkomstig van 2 tot 3 bacillen. Toch werd geen IS2606 noch KR gedetecteerd. Bovendien werden de IS2404/KR real-time PCR testen voor alle positieve amoebenculturen 3 keer herhaald, maar slechts bij 1 staal (waarbij we daarvoor 9,97

kopieën van IS2404 detecteerden) werd IS2404 een tweede keer gedetecteerd (slechts in 0,13 kopieën per μL DNA extract). Bij de derde herhaling was ook dit staal negatief. Dit kan op drie manieren verklaard worden. (1) De PCR reactiemixen waren gecontamineerd, (2) de DNA concentraties in het extract waren dermate laag dat de kans om het te detecteren in 1 μL extract zeer klein is of. De eerste verklaring kan nooit uitgesloten worden, al is de kans dat contaminatie optrad redelijk klein vermits positieve extractie en PCR controles pas aan reactiemixen werden toegevoegd wanneer alle andere buisjes al luchtdicht afgesloten waren. Contaminatie tijdens het bereiden van PCR-reactiemixen of tijdens de extractie kan wel verklaren waarom de IS2404 bevattende mycobacteriën (nog) niet gekweekt konden worden. De tweede hypothese kan de lage detectiefrequenties verklaren van die culturen met slechts 2,60 tot 9,97 IS2404 kopieën per μL ; voor het DNA extract met 497,13 IS2404 kopieën per μL is het echter minder logisch om deze verklaring te hanteren. Wanneer IS2404 in omgevingsstalen gedetecteerd wordt, is inderdaad in veel studies het al moeilijk gebleken om dit resultaat te herhalen (Stinear et al., 2000). De onsuccesvolle kweek van IS2404 bevattende mycobacteriën uit de amoebenculturen kan overigens ook te wijten zijn aan deze lage concentraties. Dit betekent bovendien dat misschien nog vele andere amoebenculturen en onverwerkte stalen ook IS2404 positief zijn zonder dat we ze konden detecteren met een enkele test.

Het is mogelijk dat de IS2404 sequentie die we detecteerden in onze amoebenculturen afkomstig is van *M. ulcerans*. Zoals aangetoond door Eddyani et al. (in voorbereiding) kan een intracellulair verblijf van *M. ulcerans* in amoeben *in vitro* zorgen voor een positieve selectie van virulentie-eigenschappen. Ook bij *M. avium* en *L. pneumophila* leidt een amoebenpassage tot een verhoging van de virulentie (Cirillo et al., 1997 en 1999). Vermits wij hier een aanwijzing hebben dat *M. ulcerans* mogelijks in zijn natuurlijke omgeving interacties aangaat met amoeben, vormen we de hypothese dat deze interacties ervoor zorgen dat ook in deze omgeving geselecteerd wordt voor virulentere *M. ulcerans* stammen. Zo zou de virulentie van *M. ulcerans* in de omgeving onderhouden kunnen blijven en zo ook zijn vermogen om mensen te infecteren

2.4. Bespreking van de gebruikte methodes

DNA-extractie van de amoebenculturen werd pas uitgevoerd na terugkomst van Ghana in België. Zeventien van de 180 amoebenculturen overleefde de bewaarperiode bij 4°C tussen kweek in Ghana en kweek in België niet en konden dus niet worden geanalyseerd op de aanwezigheid van mycobacteriën.

In Ghana en België werd geprobeerd de culturen te zuiveren van contaminanten, maar dit was niet succesvol bij 11 culturen, voornamelijk door de aanwezigheid van schimmels die sneller groeiden dan de amoeben. De contaminaties veroorzaakten geen PCR-inhibitie en beïnvloedden blijkbaar ook niet de aanwezigheid van mycobacteriën: in 4 van deze besmette amoebenculturen werd mycobacteriëel 16S DNA gedetecteerd. Niettemin is het in deze gevallen niet zeker of de mycobacteriën geassocieerd waren met amoeben dan wel met de contaminanten.

Met lichtmicroscopie werden geen mycobacteriën intracellulair in de amoeben geobserveerd. Vermits de wand van de meeste types van amoebencysten ook paars kleurde door carbofuchsine zou het in die gevallen niet mogelijk geweest zijn om intracellulaire mycobacteriën te onderscheiden. Het was misschien beter als we de uitstrijkjes hadden gekleurd met carbofuchsine in combinatie met malachietgroen (de zogenaamde Gimenezkleuring; Gimenez et al., 1964) i.p.v. door Ziehl-Neelsen kleuring. Deze techniek wordt namelijk preferabel gebruikt om zuurvasten in amoeben te identificeren (Greub en Raoult, 2004). Desalniettemin observeerden we bij enkele uitstrijkjes alleen trofozoieten en ook hier werden geen intracellulaire mycobacteriën aangetroffen.

Het is mogelijk dat na een intracellulair verblijf de mycobacteriën terug uitgestoten worden of zelf de amoeben verlaten, of dat ze altijd al saprofytisch leefden op gesecreteerde producten van de amoeben. Steinert et al. (1998) toonden bijvoorbeeld aan dat *M. avium* zich even snel intracellulair in *A. polyphaga* vermenigvuldigt als vrijlevend als saprofyt op de excretieproducten van de amoeben.

Niet alle amoeben op agarplaten konden duidelijk onder de lichtmicroscopie geïdentificeerd worden als zijnde amoeben. Bij twijfel werd de aanwezigheid nagegaan op de gekleurde uitstrijkjes. Bij 14 culturen kon zo worden bevestigd dat er geen amoeben aanwezig waren op de agarplaten. In Ghana werden geen uitstrijkjes gemaakt ter verificatie, dus is het mogelijk dat amoeben vroeger aanwezig waren maar het transport niet overleefden. Hoe dan ook, 1 van deze 14 valse amoebenculturen testte positief voor het mycobacteriëel 16S rRNA gen (zuurvaste staven werden niet gedetecteerd bij deze cultuur). Dit resultaat kan op drie manieren verklaard worden: (1) de oplossing afgeschraapt van de agarplaat werd gecontamineerd tijdens de DNA-extractie, (2) het DNA extract werd gecontamineerd tijdens het maken van de PCR reactiemix of (3) mycobacteriën kunnen naast saprofytisch op amoebenexcreta ook saprofytisch op excreta van andere organismen overleven, zoals die van *E. coli* waar de

agarplaten mee bestreken waren. Vermits zowel de negatieve extractie- als de negatieve PCR controles negatief waren voor het 16S rRNA gen, kunnen we besluiten dat de derde verklaring het meest plausibel is. Bovendien vertoont de situatie op de met *E. coli* bestreken agarplaten enige gelijkenissen met de omstandigheden die gecreëerd worden in biofilms. Dit zijn namelijk ook gemeenschappen van bacteriën en protozoa die zich mede in stand houden door zich te voeden op elkanders excretieproducten. Deze bevinding betekent echter ook dat we niet kunnen concluderen dat de mycobacteriën die we detecteerden in de echte amoebenculturen hier bevorderlijk groeiden omwille van de amoeben of omwille van de biofilm-achtige condities gecreëerd door *E. coli*, de amoeben en eventuele andere contaminanten.

3. *M. ulcerans*, amoeben en zijn andere potentiële gastheren: een relatie met BU endemiciteit?

Eén ruw biofilmstaal en twee amoebenculturen waren afkomstig uit laag BU endemische dorpen en waren positief voor IS2404. Zoals vermeld is het door de lage concentraties van de sequentie in het DNA extract niet mogelijk om te bevestigen noch te weerleggen dat het DNA afkomstig was van *M. ulcerans*. Als dit wel zo zou zijn, dan zou dit betekenen dat ook bij dorpen waar (nog) geen gevallen van BU gekend zijn *M. ulcerans* bacillen in hun wateren kunnen huizen. Williamson et al. (2008) detecteerde ook even vaak *M. ulcerans* in BU endemische als in niet endemische gebieden in water, biofilms en insecten. Dit en onze bevinding kunnen op verschillende manieren verklaard worden: (1) de mensen uit laag BU endemische gebieden zijn verschillend van mensen uit hoog BU endemische gebieden, bijvoorbeeld in hun gedrag (Pouillot et al., 2004) of in hun genetische achtergrond (Stienstra et al., 2006); (2) transmissie van *M. ulcerans* naar de mens verloopt niet vanuit water, biofilms, invertebraten, vissen of protozoa; (3) *M. ulcerans* is enkel in staat de mens te bereiken vanuit specifieke soorten invertebraten en/of protozoa die nog niet zijn onderscheiden; (4) *M. ulcerans* koloniseerde pas recent deze niet endemische gebieden zodat ze binnenkort wel endemisch zullen worden. Deze laatste hypothese wordt deels bevestigd door een recente studie van Portaels et al. (in voorbereiding) in Benin. Zij vonden wel significant meer aquatische insecten positief voor IS2404 in hoog endemische gemeenschappen in vergelijking met middelmatig en laag endemische gebieden, hoewel in het minst endemische gebied geen BU gevallen bekend waren maar wel IS2404 positieve insecten gevonden werden. In dit niet-endemische gebied werden in het volgende jaar echter wel twee gevallen van BU bevestigd. Bovendien daalde in de hoog endemische gemeenschap het aantal BU patiënten in twee jaar tijd, in correlatie met het verminderde aantal *M. ulcerans* positieve wantsen in dat

gebied (Portaels et al., in voorbereiding). Anderzijds weten we niet zeker of de IS2404 bevattende mycobacteriën in deze studie wel degelijk *M. ulcerans* zijn.

Slechts wanneer uitvoerig taxonomisch onderzoek is uitgevoerd op de organismen die tot nu positief testten voor *M. ulcerans* kan de tweede hypothese al dan niet verworpen worden. Ook in de huidige studie is (nog) niet geweten of de IS2404 herbergende amoeben uit verschillende soorten bestonden noch of deze soorten misschien een verschillend verspreidingspatroon kenden. Wel bleek uit experimenteel onderzoek op bijtende wantsen dat twee verschillende genera succesvol *M. ulcerans* wisten over te brengen op muizen. Het belang van deze wantsen in de daadwerkelijke transmissie wordt echter betwist, vermits bijtende wantsen slechts zelden mensen bijten, ze statistisch gezien even vaak voorkomen in BU endemische en niet endemische gebieden (hoewel ze nooit werden geïdentificeerd tot op soortniveau), en in beide gebieden bovendien even vaak positief voor *M. ulcerans* waren (Benbow et al., 2008). Ook muggen zijn na uitgebreide studies aangehaald als potentiële vectoren voor *M. ulcerans* in Australië en hier werd *M. ulcerans* eveneens gedetecteerd op of in verschillende muggensoorten. Er was een verband tussen BU endemiciteit en het aantal muggen positief voor *M. ulcerans* (Johnson et al., 2007) en muggenbeten zou een risicofactor zijn voor het vergaren van de ziekte (Quek et al., 2007; Pouillot et al., 2007). Identificatie van de muggensoorten zorgde in dit onderzoek voor de ontdekking van een intrigerend patroon: BU incidentie is gecorreleerd met het seizoenaal patroon van voorkomen van *Aedes camptorynchus*, de soort die het meest frequent *M. ulcerans* positief bevonden was (Johnson en Lavender, 2009). Bovendien correleerde BU incidentie met de incidentie van het Ross River virus, een infectieziekte waarvan *A. camptorynchus* de voornaamste vector is (Johnson en Lavender, 2009).

In deze insectenstudies en alle andere omgevingsstudies, inclusief de huidige, moest men telkens concluderen dat *M. ulcerans* slechts in zeer lage concentraties aanwezig was, als het al aanwezig was. Dit ondersteunt weer eerder de eerste hypothese, namelijk dat de transmissie niet verloopt via elementen van aquatische ecosystemen. Epidemiologische studies geven echter aan dat BU verspreiding gelinkt is aan het voorkomen van traagstromend of stilstaand water, maar dit hoeft niet te betekenen dat het *M. ulcerans* reservoir een onderdeel is van deze wateren. Een zoogdierreservoir kan bijvoorbeeld ook niet uitgesloten worden; in Australië werden enkele geïnfecteerde koala's en buidelratten gerapporteerd. Momenteel onderzoeken onze collega's in het kader van het VLIR project waar deze studie ook deel uit maakt of kleine zoogdieren een mogelijk reservoir voor *M. ulcerans* vormen in Ananekrom, één van de hoog BU endemische dorpen die wij ook bemonsterden. Tot nu toe werd echter nog geen individu IS2404 positief bevonden.

In deze studie vonden we dat het water in hoog BU endemische dorpen significant warmer was dan in laag BU endemische dorpen (Figuur 4). Deze verlaging van de temperatuur kan te wijten zijn aan het feit dat de waterlichamen van laag BU endemische dorpen misschien iets meer beschaduwd waren door hogere bomen. Hoewel dit op zich uiteraard de BU verspreiding niet kan verklaren, kan het wel een factor zijn die de verspreiding van het echte, maar onbekende, reservoir beïnvloedt.

4. Conclusie

Deze studie bevestigt de associatie van mycobacteriën met amoeben in tropische waterlichamen van Ghana en toont bovendien aan dat IS2404 bevattende mycobacteriën, zoals *M. ulcerans*, mee kunnen groeien met amoeben in een xenische cultuur. Resultaten van deze studie suggereren eveneens dat amoeben waarschijnlijk geen bepalende factor zijn voor de verspreiding van IS2404 bevattende mycobacteriën, vermits we geen amoeben isoleerden uit het staal waar we waarschijnlijk *M. ulcerans* in detecteerden (of een nauwe verwant hiervan). Bovendien suggereren onze resultaten dat amoeben waarschijnlijk geen rol spelen in de transmissie van *M. ulcerans*, vermits de amoebenculturen waarin IS2404 bevattende mycobacteriën gedetecteerd werden afkomstig waren van stalen zowel uit hoog als laag endemische dorpen, hoewel soortidentificatie van de amoeben deze conclusie nog kan veranderen alsook een longitudinale monitoring van de BU prevalentie in de huidig laag endemische dorpen. Hoe dan ook, het feit dat door isolatie van amoeben meer stalen konden ontdekt worden met IS2404 positieve mycobacteriën dan door analyse van onverwerkte stalen, geeft aan dat amoebenculturen mogelijk de basis kunnen vormen voor een verbeterde detectie van *M. ulcerans* in de omgeving. De techniek zou moeten verbeterd worden, ofwel kan een gelijkaardige en waarschijnlijk succesvollere techniek, zoals isolatie door co-cultivatie met amoeben, gehanteerd worden. Co-cultivatie met amoeben (voor het eerst beschreven in La Scola et al., 2001) is een selectieve manier om amoebenresistente bacteriën te isoleren, zoals *M. ulcerans* er één is, en is in het verleden al succesvol geweest om nieuwe pathogenen en hun verspreiding te identificeren (Thomas et al., 2006a, 2006b en 2008; Pagnier et al., 2008; Evstigneeva et al., 2009).

Amoeben zijn misschien niet het belangrijkste habitat voor *M. ulcerans* in de natuur, maar vormen wel een hoopvol mechanisme om dit habitat te kunnen ontdekken.

VI. Dankwoord

Ten eerste wil ik Herwig Leirs bedanken, die ook voor een Cel-en Systeem student een boeiende thesis heeft kunnen regelen en die mij (voor een tweede keer) deed belanden in Afrika, wat mijn thesis en mijn leven alleen maar boeiender maakten. Ik dank Françoise Portaels om mij een plaats te geven in haar gerenommeerde onderzoeksgroep. De rest van het vlotte verloop van mijn thesis heb ik voornamelijk te danken aan Miriam Eddyani, mijn begeleidster en ontwerper van deze studie. Ik had het geluk om ook op de hulp en raad van een tweede fantastische begeleidster, Lies Durnez, te kunnen rekenen.

Anthony Ablordey wil ik bedanken voor de begeleiding in Ghana en het hele Bacteriology Unit van Noguchi Memorial Institute in Accra om mij vriendelijk op te vangen en te laten werken in hun labo's.

Het veldwerk en de laboratorium-analyses uitgevoerd in Ghana deed ik in volledige samenwerking met Diana Ackon Amisah. Verder hielp Koen Vandelannoote met het veldwerk en implementeerde hij de real-time PCR testen waarmee ik en Diana *M. ulcerans* zouden kunnen detecteren in onze stalen. Het veldwerk had niet kunnen plaatsvinden zonder onze gids Kabiru Mohammed Abass, die alle BU patiënten uit de Agogo regio bij naam kende, en onze uitstekende chauffeur Lamquaye Wellington.

Ik wil ook het Provinciaal Instituut voor Hygiëne en Flinn De Vleeschauwer (Departement Industriële Wetenschappen en Technologie, KDG Hogeschool) bedanken voor het uitlenen van zeven; en Lieven Bervoets (UA, Departement Biologie - Ecofysiologie, Biochemie en Toxicologie) voor het uitlenen van de pH- en zuurstofmeters.

Krista Fissette van het ITG hielp mij onvermoeid met vannalles en nog wat, haar hulp met mycobacterieculturen en haar algemeen enthousiasme is van onschatbare waarde geweest. Van de mycobacteriologie eenheid van het ITG dank ik verder ten zeerste Cécile Uwizeye voor het uitvoeren van enkele gel-elektroforeses, Anita Van Aerde voor het uitvoeren van PCR van de mycobacterieculturen en Pim De Rijck voor de analyse van de 16SrRNA sequenties en heel wat raad over PCR's.

Ik dank Stefan Van Dongen en Benny Borremans voor hulp met de statistische analyses. Deze thesis werd gefinancierd door VLIR-UOS en het ITG. Ik dank ook VLIR-UOS voor het verschaffen van een reisbeurs.

Ten slotte wil ik ook mijn ouders bedanken, voor alle mogelijke steun dat ze hadden kunnen geven gedurende mijn Biologie opleiding, met deze thesis als eindwerk.

VI. Referenties

- Ablordey, A.; Swings, J.; Hubans, C.; Chemlal, K.; Loch, C.; Portaels, F. & Supply, P. (2005), 'Multilocus variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium ulcerans*', *Journal Of Clinical Microbiology* **43**(4), 1546--1551.
- Adekambi, T.; Ben Salah, S.; Khlif, M.; Raoult, D. & Drancourt, M. (2006), 'Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*', *Applied And Environmental Microbiology* **72**(9), 5974--5981.
- Adusumilli, S.; Mve-Obiang, A.; Sparer, T.; Meyers, W.; Hayman, J. & Small, P. L. C. (2005), 'Mycobacterium ulcerans toxic macrolide, mycolactone modulates the host immune response and cellular location of *M. ulcerans* in vitro and in vivo.', *Cell Microbiol* **7**(9), 1295--1304.
- Adékambi, T. & Drancourt, M. (2006), 'Isolation of *Mycobacterium septicum* from the sputum of a patient suffering from hemoptoic pneumonia.', *Res Microbiol* **157**(5), 466--470.
- Adékambi, T.; Reynaud-Gaubert, M.; Greub, G.; Gevaudan, M.-J.; Scola, B. L.; Raoult, D. & Drancourt, M. (2004), 'Amoebal coculture of "*Mycobacterium massiliense*" sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia.', *J Clin Microbiol* **42**(12), 5493--5501.
- Aiga, H.; Amano, T.; Cairncross, S.; Adomako, J. A.; Nanas, O. K. & Coleman, S. (2004), 'Assessing water-related risk factors for Buruli ulcer: A case-control study in Ghana.', *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* **71**(6), 836--836.
- Aksozek, A.; McClellan, K.; Howard, K.; Niederkorn, J. Y. & Alizadeh, H. (2002), 'Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions.', *J Parasitol* **88**(3), 621--623.
- Alsam, S.; Jeong, S. R.; Sissons, J.; Dudley, R.; Kim, K. S. & Khan, N. A. (2006), 'Escherichia coli interactions with *Acanthamoeba*: a symbiosis with environmental and clinical implications.', *J Med Microbiol* **55**(Pt 6), 689--694.
- Barker, J. & Brown, M. R. (1994), 'Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment.', *Microbiology* **140** (Pt 6), 1253--1259.
- Barker, J.; Brown, M. R.; Collier, P. J.; Farrell, I. & Gilbert, P. (1992), 'Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation.', *Appl Environ Microbiol* **58**(8), 2420--2425.
- Barker, J.; Scaife, H. & Brown, M. R. (1995), 'Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*.', *Antimicrob Agents Chemother* **39**(12), 2684--2688.
- Benbow, M. E.; Williamson, H.; Kimbirauskas, R.; McIntosh, M. D.; Kolar, R.; Quaye, C.; Akpabey, F.; Boakye, D.; Small, P. & Merritt, R. W. (2008), 'Aquatic invertebrates as unlikely vectors of Buruli ulcer disease', *Emerging Infectious Diseases* **14**(8), 1247--1254.
- Bercovier, H.; Kafri, O. & Sela, S. (1986), 'Mycobacteria Possess A Surprisingly Small Number Of Ribosomal-Rna Genes In Relation To The Size Of Their Genome', *Biochemical And Biophysical Research Communications* **136**(3), 1136--1141.
- Bermudez, L. E.; Parker, A. & Goodman, J. R. (1997), 'Growth within macrophages increases the efficiency of *Mycobacterium avium* in invading other macrophages by a complement receptor-independent pathway.', *Infect Immun* **65**(5), 1916--1925.
- Boom, R.; Sol, C. J.; Salimans, M. M.; Jansen, C. L.; van Dillen, P. M. W. & van der Noordaa, J. (1990), 'Rapid and simple method for purification of nucleic acids.', *J Clin Microbiol* **28**(3), 495--503.
- Bozue, J. A. & Johnson, W. (1996), 'Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion.', *Infect Immun* **64**(2), 668--673.
- Brennen, P. J. & Nikaido, H. (1995), 'The Envelope Of Mycobacteria', *Annual Review Of Biochemistry* **64**, 29--63.
- Brinley, F.J (1929), 'The effect of ammonium salts on protoplasm of amoeba', *Biol. Bull.* **56**, 371-378.

- Brooks, R. W.; George, K. L.; Parker, B. C.; Falkinham, J. O. & Gruff, H. (1984a), 'Recovery and survival of nontuberculous mycobacteria under various growth and decontamination conditions.', *Can J Microbiol* **30**(9), 1112--1117.
- Brooks, R. W.; Parker, B. C.; Gruff, H. & Falkinham, J. O. (1984b), 'Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. V. Numbers in eastern United States soils and correlation with soil characteristics.', *Am Rev Respir Dis* **130**(4), 630--633.
- Brou, T.; Broutin, H.; Elguero, E.; Asse, H. & Guegan, J. F. (2008), 'Landscape Diversity Related to Buruli Ulcer Disease in Cote d'Ivoire', *Plos Neglected Tropical Diseases* **2**(7), e271.
- Carson, L.A., Cusick, L. B.; Bland, L. A. & Favero, M. S. (1988), 'Efficacy Of Chemical Dosing Methods For Isolating Nontuberculous Mycobacteria From Water-Supplies Of Dialysis Centers', *Applied And Environmental Microbiology* **54**(7), 1756--1760.
- Casadevall, A. (2008), 'Evolution of Intracellular Pathogens', *Annual Review Of Microbiology* **62**, 19--33.
- Chemlal, K.; Huys, G.; Laval, F.; Vincent, V.; Savage, C.; Gutierrez, C.; Laneelle, M.-A.; Swings, J.; Meyers, W. M.; Daffe, M. & Portaels, F. (2002), 'Characterization of an unusual Mycobacterium: a possible missing link between Mycobacterium marinum and Mycobacterium ulcerans.', *J Clin Microbiol* **40**(7), 2370--2380.
- Cirillo, J. D.; Cirillo, S. L.; Yan, L.; Bermudez, L. E.; Falkow, S. & Tompkins, L. S. (1999), 'Intracellular growth in Acanthamoeba castellanii affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of Legionella pneumophila.', *Infect Immun* **67**(9), 4427--4434.
- Cirillo, J. D.; Falkow, S. & Tompkins, L. S. (1994), 'Growth of Legionella pneumophila in Acanthamoeba castellanii enhances invasion.', *Infect Immun* **62**(8), 3254--3261.
- Cirillo, J. D.; Falkow, S.; Tompkins, L. S. & Bermudez, L. E. (1997), 'Interaction of Mycobacterium avium with environmental amoebae enhances virulence', *Infection And Immunity* **65**(9), 3759--3767.
- Cloud, J. L.; Meyer, J. J.; Pounder, J. I.; Jost, K. C.; Sweeney, A.; Carroll, K. C. & Woods, G. L. (2006), 'Mycobacterium arupense sp. nov., a non-chromogenic bacterium isolated from clinical specimens.', *Int J Syst Evol Microbiol* **56**(Pt 6), 1413--1418.
- Cosma, C. L.; Sherman, D. R. & Ramakrishnan, L. (2003), 'The secret lives of the pathogenic mycobacteria', *Annual Review Of Microbiology* **57**, 641--676.
- Cosson, P. & Soldati, T. (2008), 'Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria.', *Curr Opin Microbiol* **11**(3), 271--276.
- Coutanceau, E.; Marsollier, L.; Brosch, R.; Perret, E.; Goossens, P.; Tanguy, M.; Cole, S. T.; Small, P. L. C. & Demangel, C. (2005), 'Modulation of the host immune response by a transient intracellular stage of Mycobacterium ulcerans: the contribution of endogenous mycolactone toxin', *Cellular Microbiology* **7**(8), 1187--1196.
- Daillox, M.; Laurain, C.; Weber, M. & Hartemann, P. (1999), 'Water and nontuberculous mycobacteria', *Water Research* **33**(10), 2219--2228.
- Debacker, M.; Aguiar, J.; Steunou, C.; Zinsou, C.; Meyers, W. M.; Scott, J. T.; Dramaix, M. & Portaels, F. (2004), 'Mycobacterium ulcerans disease: role of age and gender in incidence and morbidity.', *Trop Med Int Health* **9**(12), 1297--1304.
- Debacker, M.; Portaels, F.; Aguiar, J.; Steunou, C.; Zinsou, C.; Meyers, W. & Dramaix, M. (2006), 'Risk factors for Buruli ulcer, Benin.', *Emerg Infect Dis* **12**(9), 1325--1331.
- Debacker, M.; Zinsou, C.; Aguiar, J.; Meyers, W. M. & Portaels, F. (2003), 'First case of Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer) following a human bite.', *Clin Infect Dis* **36**(5), e67--e68.
- Demangel, C.; Stinear, T. P. & Cole, S. T. (2009), 'Buruli ulcer: reductive evolution enhances pathogenicity of Mycobacterium ulcerans', *Nature Reviews Microbiology* **7**(1), 50--60.
- Dobos, K. M.; Quinn, F. D.; Ashford, D. A.; Horsburgh, C. R. & King, C. H. (1999), 'Emergence of a unique group of necrotizing mycobacterial diseases', *Emerging Infectious Diseases* **5**(3), 367--378.
- Drancourt, M.; Jarlier, V. & Raoult, D. (2002), 'The environmental pathogen Mycobacterium ulcerans grows

in amphibian cells at low temperatures.', *Appl Environ Microbiol* **68**(12), 6403--6404.

Durnez, L.; Eddyani, M.; Mgode, G. F.; Katakweba, A.; Katholi, C. R.; Machang'u, R. R.; Kazwala, R. R.; Portaels, F. & Leirs, H. (2008), 'First detection of mycobacteria in African rodents and insectivores, using stratified pool screening', *Applied And Environmental Microbiology* **74**(3), 768--773.

Durnez, L.; Stragier, P.; Roebben, K.; Ablordey, A.; Leirs, H. & Portaels, F. (2009), 'A comparison of DNA extraction procedures for the detection of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer, in clinical and environmental specimens', *Journal Of Microbiological Methods* **76**(2), 152--158.

Eddyani, M.; Jonckheere, J. F. D.; Durnez, L.; Suykerbuyk, P.; Leirs, H. & Portaels, F. (2008), 'Occurrence of free-living amoebae in communities of low and high endemicity for Buruli ulcer in southern Benin.', *Appl Environ Microbiol* **74**(21), 6547--6553.

Eddyani, M.; Ofori-Adjei, D.; Teugels, G.; De Weirdt, D.; Boakye, D.; Meyers, W. M. & Portaels, F. (2004), 'Potential role for fish in transmission of *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer): an environmental study', *Applied And Environmental Microbiology* **70**(9), 5679--5681.

Elsner, L.; Wayne, J.; O'Brien, C. R.; McCowan, C.; Malik, R.; Hayman, J. A.; Globan, M.; Lavender, C. J. & Fyfe, J. A. (2008), 'Localised *Mycobacterium ulcerans* infection in a cat in Australia.', *J Feline Med Surg* **10**(4), 407--412.

Evstigneeva, A.; Raoult, D.; Karpachevskiy, L. & Scola, B. L. (2009), 'Amoeba co-culture of soil specimens recovered 33 different bacteria, including four new species and *Streptococcus pneumoniae*.' *Microbiology* **155**(Pt 2), 657--664.

Falkinham, J. O. (2002), 'Nontuberculous mycobacteria in the environment', *Clinics In Chest Medicine* **23**(3), 529-551

Falkinham, J. O. (1996), 'Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria', *Clinical Microbiology Reviews* **9**(2), 177-215

Falkinham, J. O., G. N. J. B. A. D. & Portaels, F. (2004), 'Natural ecology and survival in water of mycobacteria of potential public health significance' *Pathogenic mycobacteria in water: a guide to public health consequences, monitoring and management*. IWA Publishing, London, United Kingdom, IWA Publishing, London, United Kingdom, .

Fraser, S. L., R. M. Plemmons, D. P. Dooley, C. E. Davis, M. C. Garces, B. A. Brown, D. Grubber, & R. J. Wallace (1999), 'Identification and control of an outbreak of rapidly growing mycobacterial infections in a bone marrow transplant unit', abstr. 469, p. 121. *37th Annu. Meet. Infect. Dis. Soc. Am., Philadelphia, Pa.*

Fritsche, T. R. ; Gautom, R. K.; Seyedirshiti, S.; Bergeron, D. L. & Lindquist, T. D. (1993), 'Occurrence Of Bacterial Endosymbionts In *Acanthamoeba* Spp Isolated From Corneal And Environmental Specimens And Contact-Lenses', *Journal Of Clinical Microbiology* **31**(5), 1122--1126.

Frothingham, R. & Wilson, K. H. (1994), 'Molecular phylogeny of the *Mycobacterium avium* complex demonstrates clinically meaningful divisions.', *J Infect Dis* **169**(2), 305--312.

Fyfe, J. A. M.; Lavender, C. J.; Johnson, P. D. R.; Globan, M.; Sievers, A.; Azuolas, J. & Stinear, T. P. (2007), 'Development and application of two multiplex real-time PCR assays for the detection of *Mycobacterium ulcerans* in clinical and environmental samples.', *Appl Environ Microbiol* **73**(15), 4733--4740.

George, K. M.; Pascopella, L.; Welty, D. M. & Small, P. L. C. (2000), 'A *Mycobacterium ulcerans* toxin, mycolactone, causes apoptosis in guinea pig ulcers and tissue culture cells', *Infection And Immunity* **68**(2), 877--883.

Gilks, W.; Thomas, A. & D.J., S. (1994), 'A language and program for complex Bayesian modelling.' *The Statistician* **43**, 69-178.

Gimenez, D. F. (1964), 'Staining Rickettsiae in yolk-sac cultures.', *Stain Technol* **39**, 135--140.

Goldschmidt, P.; Degorge, S.; Saint-Jean, C.; Yera, H.; Year, H.; Zekhnini, F.; Batellier, L.; Laroche, L. & Chaumeil, C. (2008), 'Resistance of *Acanthamoeba* to classic DNA extraction methods used for the diagnosis of corneal infections.', *Br J Ophthalmol* **92**(1), 112--115.

Greub, G. & Raoult, D. (2004), 'Microorganisms resistant to free-living amoebae', *Clinical Microbiology Reviews* **17**(2), 413--+

- Hahn, M. W.; Moore, E. R. & Höfle, M. G. (1999), 'Bacterial filament formation, a defense mechanism against flagellate grazing, is growth rate controlled in bacteria of different phyla.', *Appl Environ Microbiol* **65**(1), 25--35.
- Hilty, M.; Yeboah-Manu, D.; Boakye, D.; Mensah-Quainoo, E.; Rondini, S.; Schelling, E.; Ofori-Adjei, D.; Portaels, F.; Zinsstag, J. & Pluschke, G. (2006), 'Genetic diversity in *Mycobacterium ulcerans* isolates from Ghana revealed by a newly identified locus containing a variable number of tandem repeats', *Journal Of Bacteriology* **188**(4), 1462--1465.
- Hong, H.; Spencer, J. B.; Porter, J. L.; Leadlay, P. F. & Stinear, T. (2005), 'A novel mycolactone from a clinical isolate of *Mycobacterium ulcerans* provides evidence for additional toxin heterogeneity as a result of specific changes in the modular polyketide synthase.', *Chembiochem* **6**(4), 643--648.
- Horsburgh, C. R. (1996), 'Epidemiology of disease caused by nontuberculous mycobacteria.', *Semin Respir Infect* **11**(4), 244--251.
- Iivanainen, E. (1995), 'Isolation Of Mycobacteria From Acidic Forest Soil Samples - Comparison Of Culture Methods', *Journal Of Applied Bacteriology* **78**(6), 663--668.
- Iivanainen, E.; Martikainen, P. J. & Katila, M. L. (1997), 'Comparison of some decontamination methods and growth media for isolation of mycobacteria from northern brook waters.', *J Appl Microbiol* **82**(1), 121--127.
- Iivanainen, E.; Martikainen, P. J.; Väänänen, P. & Katila, M. L. (1999), 'Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook sediments.', *J Appl Microbiol* **86**(4), 673--681.
- Iivanainen, E. K.; Martikainen, P. J.; Väänänen, P. K. & Katila, M.-L. (1993), 'Environmental Factors Affecting the Occurrence of Mycobacteria in Brook Waters.', *Appl Environ Microbiol* **59**(2), 398--404.
- Johnson, P. D. R.; Aзуolas, J.; Lavender, C. J.; Wishart, E.; Stinear, T. P.; Hayman, J. A.; Brown, L.; Jenkin, G. A. & Fyfe, J. A. M. (2007), 'Mycobacterium ulcerans in mosquitoes captured during outbreak of buruli ulcer, Southeastern Australia', *Emerging Infectious Diseases* **13**(11), 1653--1660.
- Johnson, P. D. R. & Lavender, C. J. (2009), 'Correlation between Buruli ulcer and vector-borne notifiable diseases, Victoria, Australia.', *Emerg Infect Dis* **15**(4), 614--615.
- Johnson, R. C.; Sopoh, G. E.; Boko, M.; Zinsou, C.; Gbovi, J.; Makoutode, M. & Portaels, F. (2005), 'Distribution of the infection Mycobacterium ulcerans (Buruli ulcer) in the villages of Lalo in Benin', *Tropical Medicine & International Health* **10**(9), 863--871.
- Judd, T. C.; Bischoff, A.; Kishi, Y.; Adusumilli, S. & Small, P. L. C. (2004), 'Structure determination of mycolactone C via total synthesis.', *Org Lett* **6**(26), 4901--4904.
- Jürgens, K. & Matz, C. (2002), 'Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria', *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal Of General And Molecular Microbiology* **81**(1-4), 413--434.
- Kamala, T.; Paramasivan, C. N.; Herbert, D.; Venkatesan, P. & Prabhakar, R. (1994), 'Isolation and Identification of Environmental Mycobacteria in the Mycobacterium bovis BCG Trial Area of South India.', *Appl Environ Microbiol* **60**(6), 2180--2183.
- Kamala, T.; Paramasivan, C. N.; Herbert, D.; Venkatesan, P. & Prabhakar, R. (1994), 'Evaluation of Procedures for Isolation of Nontuberculous Mycobacteria from Soil and Water.', *Appl Environ Microbiol* **60**(3), 1021--1024.
- Kathuria, P.; Agarwal, K. & Koranne, R. V. (2006), 'The role of fine-needle aspiration cytology and Ziehl Neelsen staining in the diagnosis of cutaneous tuberculosis.', *Diagn Cytopathol* **34**(12), 826--829.
- Kent, M. L.; Whipps, C. M.; Matthews, J. L.; Florio, D.; Watral, V.; Bishop-Stewart, J. K.; Poort, M. & Bermudez, L. (2004), 'Mycobacteriosis in zebrafish (*Danio rerio*) research facilities', *Comparative Biochemistry And Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **138**(3), Elsevier Science Inc, 383--390.
- de Kievit, T. R. (2009), 'Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.', *Environ Microbiol* **11**(2), 279--288.
- Kirschner, R. A.; Parker, B. C. & Falkinham, J. O., 'Epidemiology Of Infection By Nontuberculous

- Mycobacteria - Mycobacterium-Avium, Mycobacterium-Intracellulare, And Mycobacterium-Scrofulaceum In Acid, Brown-Water Swamps Of The Southeastern United-States And Their Association With Environmental Variables', *American Review Of Respiratory Disease* **145**(2), 271--275.
- Kotlowski, R.; Martin, A.; Ablordey, A.; Chemlal, K.; Fonteyne, P. A. & Portaels, F. (2004), 'One-tube cell lysis and DNA extraction procedure for PCR-based detection of Mycobacterium ulcerans in aquatic insects, molluscs and fish', *Journal Of Medical Microbiology* **53**(9), 927--933.
- Kusunoki, S. & Ezaki, T. (1992), 'Proposal of Mycobacterium peregrinum sp. nov., nom. rev., and elevation of Mycobacterium chelonae subsp. abscessus (Kubica et al.) to species status: Mycobacterium abscessus comb. nov.', *Int J Syst Bacteriol* **42**(2), 240--245.
- Lewin, A. & Sharbati-Tehrani, S. (2005), '[Slow growth rate of mycobacteria. Possible reasons and significance for their pathogenicity]', *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **48**(12), 1390--1399.
- Marsollier, L.; Andre, J. P. S.; Frigui, W.; Reysset, G.; Milon, G.; Carbonnelle, B.; Aubry, J. & Cole, S. T. (2007b), 'Early trafficking events of Mycobacterium ulcerans within Naucoris cimicoides', *Cellular Microbiology* **9**(2), 347--355.
- Marsollier, L.; Aubry, J.; Coutanceau, E.; Andre, J. P. S.; Small, P. L.; Milon, G.; Legras, P.; Guadagnini, S.; Carbonnelle, B. & Cole, S. T. (2005), 'Colonization of the salivary glands of Naucoris cimicoides by Mycobacterium ulcerans requires host plasmatocytes and a macrolide toxin, mycolactone', *Cellular Microbiology* **7**(7), 935--943.
- Marsollier, L.; Aubry, J.; Milan, G. & Brodin, P. (2007a), 'Aquatic insects and transmission of Mycobacterium ulcerans', *M S-Medecine Sciences* **23**(6-7), 572--575.
- Marsollier, L.; Robert, R.; Aubry, J.; Saint Andre, J. P.; Kouakou, H.; Legras, P.; Manceau, A. L.; Mahaza, C. & Carbonnelle, B. (2002), 'Aquatic insects as a vector for Mycobacterium ulcerans', *Applied And Environmental Microbiology* **68**(9), 4623--4628.
- Marsollier, L.; Severin, T.; Aubry, J.; Merritt, R. W.; Saint Andre, J. P.; Legras, P.; Manceau, A. L.; Chauty, A.; Carbonnelle, B. & Cole, S. T. (2004a), 'Aquatic snails, passive hosts of Mycobacterium ulcerans', *Applied And Environmental Microbiology* **70**(10), 6296--6298.
- Marsollier, L.; Stinear, T.; Aubry, J.; Saint Andre, J. P.; Robert, R.; Legras, P.; Manceau, A. L.; Audrain, C.; Bourdon, S.; Kouakou, H. & Carbonnelle, B. (2004b), 'Aquatic plants stimulate the growth of and biofilm formation by Mycobacterium ulcerans in axenic culture and harbor these bacteria in the environment', *Applied And Environmental Microbiology* **70**(2), 1097--1103.
- Matz, C. & Kjelleberg, S. (2005), 'Off the hook--how bacteria survive protozoan grazing.', *Trends Microbiol* **13**(7), 302--307.
- McDonnell, G. & Russell, A. D. (1999), 'Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance', *Clinical Microbiology Reviews* **12**(1), 147--+.
- Menashe, O.; Kaganskaya, E.; Baasov, T. & Yaron, S. (2008), 'Aminoglycosides affect intracellular Salmonella enterica serovars typhimurium and virchow.', *Antimicrob Agents Chemother* **52**(3), 920--926.
- Meunier, O.; Oster, J. L.; Rousée, J. M.; Georges, S.; Hernandez, C. & Bientz, M. (2003), 'Non-tuberculous mycobacteria and homeaquariums.', *J Hosp Infect* **55**(1), 80--81.
- Meyers, W. M.; Shelly, W. M.; Connor, D. H. & Meyers, E. K. (1974), 'Human Mycobacterium ulcerans infections developing at sites of trauma to skin.', *Am J Trop Med Hyg* **23**(5), 919--923.
- Miltner, E. C. & Bermudez, L. E. (2000), 'Mycobacterium avium grown in Acanthamoeba castellanii is protected from the effects of antimicrobials.', *Antimicrob Agents Chemother* **44**(7), 1990--1994.
- Mohney, L. L.; Poulos, B. T.; Brooker, J. H.; Cage, G. D. & Lightner, D. V. (1998), 'Isolation and identification of Mycobacterium peregrinum from the Pacific white shrimp Penaeus vannamei', *Journal Of Aquatic Animal Health* **10**(1), 83--88.
- Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003), 'Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure.', *Curr Opin Biotechnol* **14**(3), 255--261.

- Molmeret, M.; Alli, O. A. T.; Zink, S.; Flieger, A.; Cianciotto, N. P. & Kwaik, Y. A. (2002), 'icmT is essential for pore formation-mediated egress of *Legionella pneumophila* from mammalian and protozoan cells.', *Infect Immun* **70**(1), 69--78.
- Molmeret, M.; Horn, M.; Wagner, M.; Santic, M. & Abu Kwaik, Y. (2005), 'Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens', *Applied And Environmental Microbiology* **71**(1), 20--28.
- Mosi, L.; Williamson, H.; Wallace, J. R.; Merritt, R. W. & Small, P. L. C. (2008), 'Persistent association of *Mycobacterium ulcerans* with West African predaceous insects of the family belostomatidae.', *Appl Environ Microbiol* **74**(22), 7036--7042.
- Mulder, A. A.; Boerma, R. P.; Barogui, Y.; Zinsou, C.; Johnson, R. C.; Gbovi, J.; van der Werf, T. S. & Stienstra, Y. (2008), 'Healthcare seeking behaviour for Buruli ulcer in Benin: a model to capture therapy choice of patients and healthy community members.', *Trans R Soc Trop Med Hyg* **102**(9), 912--920.
- Murga, R.; Forster, T. S.; Brown, E.; Pruckler, J. M.; Fields, B. S. & Donlan, R. M. (2001), 'Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system.', *Microbiology* **147**(Pt 11), 3121--3126.
- Mve-Obiang, A.; Lee, R. E.; Portaels, F. & Small, P. L. C. (2003), 'Heterogeneity of mycolactones produced by clinical isolates of *Mycobacterium ulcerans*: implications for virulence.', *Infect Immun* **71**(2), 774--783.
- Mve-Obiang, A.; Lee, R. E.; Umstot, E. S.; Trott, K. A.; Grammer, T. C.; Parker, J. M.; Ranger, B. S.; Grainger, R.; Mahrous, E. A. & Small, P. L. C. (2005), '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* **73**(6), 3307--3312.
- Nau, J.-Y. (2007), '[Protection against Buruli ulcer by aquatic insect saliva?]', *Rev Med Suisse* **3**(103), 780.
- Neumann, M.; SchulzeRobbecke, R.; Hagenau, C. & Behringer, K. (1997), 'Comparison of methods for isolation of mycobacteria from water', *Applied And Environmental Microbiology* **63**(2), 547--552.
- Niederweis, M.; Ehrt, S.; Heinz, C.; Klöcker, U.; Karosi, S.; Swiderek, K. M.; Riley, L. W. & Benz, R. (1999), 'Cloning of the *mspA* gene encoding a porin from *Mycobacterium smegmatis*.', *Mol Microbiol* **33**(5), 933--945.
- Oliveira, M. S.; Fraga, A. G.; Torrado, E.; Castro, A. G.; Pereira, J. P.; Longatto, A.; Milanezi, F.; Schmitt, F. C.; Meyers, W. M.; Portaels, F.; Silva, M. T. & Pedrosa, J. (2005), 'Infection with *Mycobacterium ulcerans* induces persistent inflammatory responses in mice', *Infection And Immunity* **73**(10), 6299--6310.
- van Oss, C. J., Gillman C. F., and Neumann A. W.. (1975), 'Phagocytic engulfment and cell adhesiveness as surface Phenomena' [H. Isenberg (ed.)]. Marcel Dekker, New York.
- Page, F. C. (1976), An illustrated key to freshwater and soil amoebae, Freshwater Biological Association, Ambleside, United Kingdom.
- Pagnier, I.; Raoult, D. & Scola, B. L. (2008), 'Isolation and identification of amoeba-resisting bacteria from water in human environment by using an *Acanthamoeba polyphaga* co-culture procedure.', *Environ Microbiol* **10**(5), 1135--1144.
- Palomino, J. C. & Portaels, F. (1998), 'Effects of decontamination methods and culture conditions on viability of *Mycobacterium ulcerans* in the BACTEC system.', *J Clin Microbiol* **36**(2), 402--408.
- Pfaller, M. A. (1994), 'Application of new technology to the detection, identification, and antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria.', *Am J Clin Pathol* **101**(3), 329--337.
- Pidot, S. J.; Hong, H.; Seemann, T.; Porter, J. L.; Yip, M. J.; Men, A.; Johnson, M.; Wilson, P.; Davies, J. K.; Leadlay, P. F. & Stinear, T. P. (2008), 'Deciphering the genetic basis for polyketide variation among mycobacteria producing mycolactones.', *BMC Genomics* **9**, 462.
- Portaels, F. (1995), 'Epidemiology of mycobacterial diseases.', *Clin Dermatol* **13**(3), 207--222.
- Portaels, F.; Chemlal, K.; Elsen, P.; Johnson, P. D.; Hayman, J. A.; Hibble, J.; Kirkwood, R. & Meyers, W. M. (2001), '*Mycobacterium ulcerans* in wild animals.', *Rev Sci Tech* **20**(1), 252--264.
- Portaels, F.; Elsen, P.; Guimaraes-Peres, A.; Fonteyne, P. A. & Meyers, W. M. (1999), 'Insects in the transmission of *Mycobacterium ulcerans* infection.', *Lancet* **353**(9157), 986.

- Portaels, F.; Fonteyne, P. A.; de Beenhouwer, H.; de Rijk, P.; Guédénon, A.; Hayman, J. & Meyers, M. W. (1996), 'Variability in 3' end of 16S rRNA sequence of *Mycobacterium ulcerans* is related to geographic origin of isolates.', *J Clin Microbiol* **34**(4), 962--965.
- Portaels, F.; Meyers, W. M.; Ablordey, A.; Castro, A. G.; Chemlal, K.; de Rijk, P.; Elsen, P.; Fissette, K.; Fraga, A. G.; Lee, R.; Mahrous, E.; Small, P. L. C.; Stragier, P.; Torrado, E.; Van Aerde, A.; Silva, M. T. & Pedrosa, J. (2008), 'First Cultivation and Characterization of *Mycobacterium ulcerans* from the Environment', *Plos Neglected Tropical Diseases* **2**(3), e178.
- Portaels, F.; Muynck, A. D. & Sylla, M. P. (1988), 'Selective isolation of mycobacteria from soil: a statistical analysis approach.', *J Gen Microbiol* **134**(3), 849--855.
- Portaels, F. & Pattyn, S. R. (1982), 'Growth of mycobacteria in relation to the pH of the medium.', *Ann Microbiol (Paris)* **133**(2), 213--221.
- Portaels, F.; Silva, M. T. & Meyers, W. M. (2009), 'Buruli ulcer.', *Clin Dermatol* **27**(3), 291--305.
- Pouillot, R.; Matias, G.; Wondje, C. M.; Portaels, F.; Valin, N.; Ngos, F.; Njikap, A.; Marsollier, L.; Fontanet, A. & Eyangoh, S. (2007), 'Risk factors for buruli ulcer: a case control study in cameroon.', *PLoS Negl Trop Dis* **1**(3), e101.
- Proca-Ciobanu, M.; Lupascu, G. H.; Petrovici, A. & Ionescu, M. D. (1975), 'Electron microscopic study of a pathogenic *Acanthamoeba castellanii* strain: the presence of bacterial endosymbionts.', *Int J Parasitol* **5**(1), 49--56.
- Quek, T. Y. J.; Athan, E.; Henry, M. J.; Pasco, J. A.; Redden-Hoare, J.; Hughes, A. & Johnson, P. D. R. (2007), 'Risk factors for mycobacterium ulcerans infection, Southeastern Australia', *Emerging Infectious Diseases* **13**(11), 1661--1666.
- R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing.
- Raghunathan, P. L.; Whitney, E. A. S.; Asamoah, K.; Stienstra, Y.; Taylor, T. H.; Amofah, G. K.; Ofori-Adjei, D.; Dobos, K.; Guarner, J.; Martin, S.; Pathak, S.; Klutse, E.; Etuafu, S.; van der Graaf, W. T. A.; van der Werf, T. S.; King, C. H.; Tappero, J. W. & Ashford, D. A. (2005), 'Risk factors for Buruli ulcer disease (*Mycobacterium ulcerans* Infection): results from a case-control study in Ghana.', *Clin Infect Dis* **40**(10), 1445--1453.
- Ranger, B. S.; Mahrous, E. A.; Mosi, L.; Adusumilli, S.; Lee, R. E.; Colorni, A.; Rhodes, M. & Small, P. L. C. (2006), 'Globally distributed mycobacterial fish pathogens produce a novel plasmid-encoded toxic macrolide, mycolactone F.', *Infect Immun* **74**(11), 6037--6045.
- Rasmussen, M. A.; Carlson, S. A.; Franklin, S. K.; McCuddin, Z. P.; Wu, M. T. & Sharma, V. K. (2005), 'Exposure to rumen protozoa leads to enhancement of pathogenicity of and invasion by multiple-antibiotic-resistant *Salmonella enterica* bearing SGI1', *Infection And Immunity* **73**(8), 4668--4675.
- Rastogi, N.; Blom-Potar, M. C. & David, H. L. (1989), 'Comparative intracellular growth of difficult-to-grow and other mycobacteria in a macrophage cell line.', *Acta Leprol* **7 Suppl 1**, 156--159.
- Rhodes, M. W.; Kator, H.; McNabb, A.; Deshayes, C.; Reyrat, J.-M.; Brown-Elliott, B. A.; Wallace, R.; Trott, K. A.; Parker, J. M.; Lifland, B.; Osterhout, G.; Kaattari, I.; Reece, K.; Vogelbein, W. & Ottinger, C. A. (2005), '*Mycobacterium pseudoshottsii* sp. nov., a slowly growing chromogenic species isolated from Chesapeake Bay striped bass (*Morone saxatilis*).', *Int J Syst Evol Microbiol* **55**(Pt 3), 1139--1147.
- Ritacco, V.; Kremer, K.; van der Laan, T.; Pijnenburg, J. E.; de Haas, P. E. & van Soolingen, D. (1998), 'Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates.', *Int J Tuberc Lung Dis* **2**(3), 242--251.
- Roberts, B. & Hirst, R. (1997), 'Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Mycobacterium ulcerans*.', *J Clin Microbiol* **35**(10), 2709--2711.
- Rodriguez-Zaragosa, S. (1994), 'Ecology of Free-Living Amoebae', *Critical Reviews in Microbiologia* **20**, 225-241.
- Ross, B. C.; Johnson, P. D. R.; Oppedisano, F.; Marino, L.; Sievers, A.; Stinear, T.; Hayman, J. A.; Veitch, M. G. K. & Robins-Browne, R. M. (1997b), 'Detection of *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples during an outbreak of ulcerative disease', *Applied And Environmental Microbiology* **63**(10), 4135--4138.

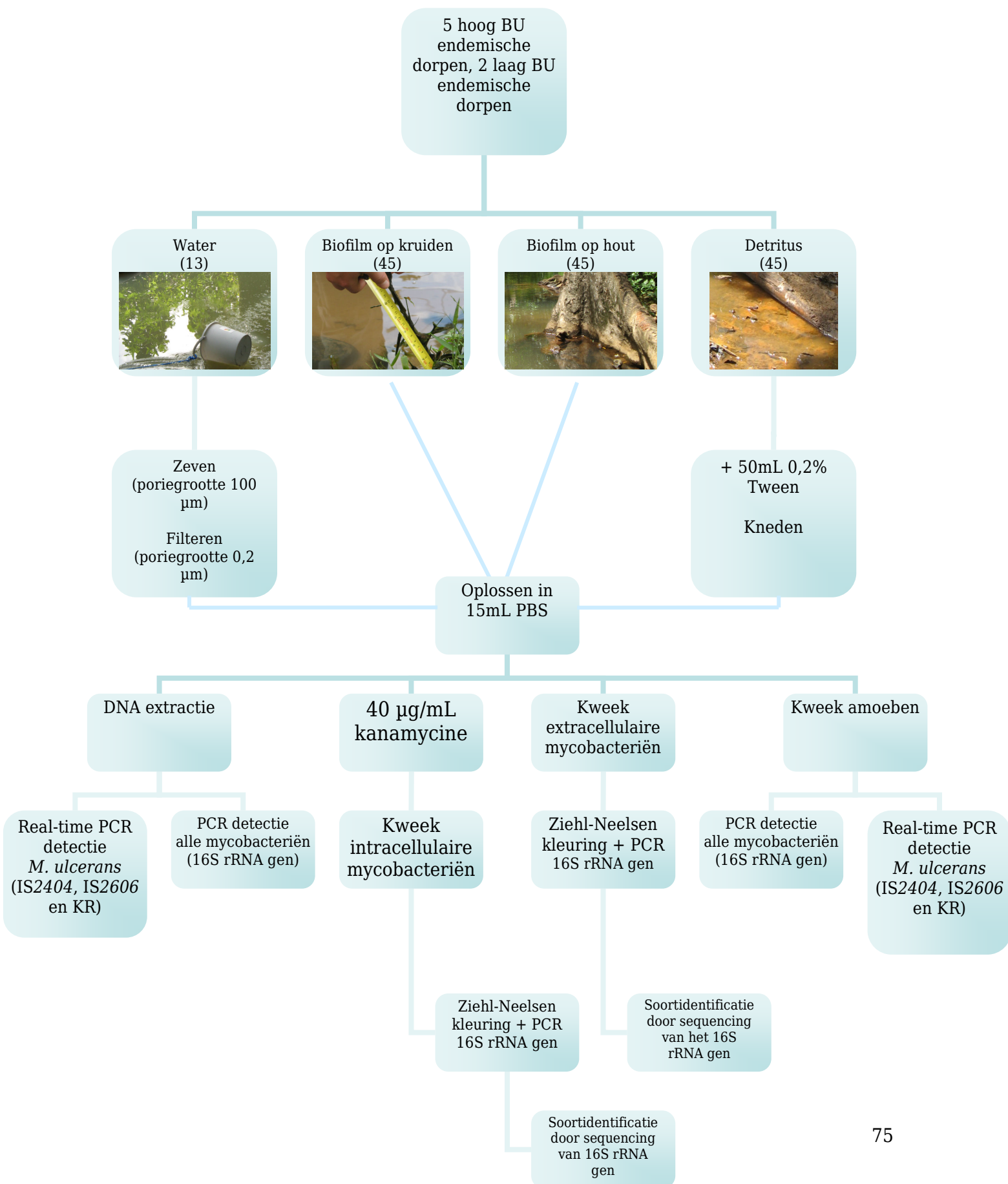
- Ross, B. C.; Marino, L.; Oppedisano, F.; Edwards, R.; RobinsBrowne, R. M. & Johnson, P. D. R. (1997a), 'Development of a PCR assay for rapid diagnosis of Mycobacterium ulcerans infection', *Journal Of Clinical Microbiology* **35**(7), 1696--1700.
- ROWBOTHAM, T. J. (1980), 'Preliminary-Report On The Pathogenicity Of Legionella-Pneumophila For Fresh-Water And Soil Amebas', *Journal Of Clinical Pathology* **33**(12), 1179--1183.
- Schinsky, M. F.; McNeil, M. M.; Whitney, A. M.; Steigerwalt, A. G.; Lasker, B. A.; Floyd, M. M.; Hogg, G. G.; Brenner, D. J. & Brown, J. M. (2000), 'Mycobacterium septicum sp. nov., a new rapidly growing species associated with catheter-related bacteraemia.', *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 2**, 575--581.
- Schinsky, M. F.; Morey, R. E.; Steigerwalt, A. G.; Douglas, M. P.; Wilson, R. W.; Floyd, M. M.; Butler, W. R.; Daneshvar, M. I.; Brown-Elliott, B. A.; Wallace, R. J.; McNeil, M. M.; Brenner, D. J. & Brown, J. M. (2004), 'Taxonomic variation in the Mycobacterium fortuitum third biovariant complex: description of Mycobacterium boenickei sp. nov., Mycobacterium houstonense sp. nov., Mycobacterium neworleansense sp. nov. and Mycobacterium brisbanense sp. nov. and recognition of Mycobacterium porcinum from human clinical isolates.', *Int J Syst Evol Microbiol* **54**(Pt 5), 1653--1667.
- Schütte, D.; Umboock, A. & Pluschke, G. (2009), 'Phagocytosis of Mycobacterium ulcerans in the course of rifampicin and streptomycin chemotherapy in Buruli ulcer lesions.', *Br J Dermatol* **160**(2), 273--283.
- Scola, B. L.; Mezi, L.; Weiller, P. J. & Raoult, D. (2001), 'Isolation of Legionella anisa using an amoebic coculture procedure.', *J Clin Microbiol* **39**(1), 365--366.
- September, S. M.; Brözel, V. S. & Venter, S. N. (2004), 'Diversity of nontuberculoïd Mycobacterium species in biofilms of urban and semiurban drinking water distribution systems.', *Appl Environ Microbiol* **70**(12), 7571--7573.
- Sharbati-Tehrani, S.; Stephan, J.; Holland, G.; Appel, B.; Niederweis, M. & Lewin, A. (2005), 'Porins limit the intracellular persistence of Mycobacterium smegmatis.', *Microbiology* **151**(Pt 7), 2403--2410.
- Siddiqui, R.; Matin, A.; Warhurst, D.; Stins, M. & Khan, N. A. (2007), 'Effect of antimicrobial compounds on Balamuthia mandrillaris encystment and human brain microvascular endothelial cell cytopathogenicity.', *Antimicrob Agents Chemother* **51**(12), 4471--4473.
- Silva, M. T.; Portaels, F. & Pedrosa, J. (2007), 'Aquatic insects and Mycobacterium ulcerans: an association relevant to Buruli ulcer control?', *PLoS Med* **4**(2), e63.
- Solomon, J. M.; Leung, G. S. & Isberg, R. R. (2003), 'Intracellular replication of Mycobacterium marinum within Dictyostelium discoïdeum: efficient replication in the absence of host coronin.', *Infect Immun* **71**(6), 3578--3586.
- Sriram, R.; Shoff, M.; Booton, G.; Fuerst, P. & Visvesvara, G. S. (2008), 'Survival of Acanthamoeba cysts after desiccation for more than 20 years.', *J Clin Microbiol* **46**(12), 4045--4048.
- Stahl, D.A. & Urbance, J. W. (1990), 'The Division Between Fast-Growing And Slow-Growing Species Corresponds To Natural Relationships Among The Mycobacteria', *Journal Of Bacteriology* **172**(1), 116--124.
- Steinert, M.; Birkness, K.; White, E.; Fields, B. & Quinn, F. (1998), 'Mycobacterium avium bacilli grow saprozoically in coculture with Acanthamoeba polyphaga and survive within cyst walls.', *Appl Environ Microbiol* **64**(6), 2256--2261.
- Stienstra, Y.; van der Graaf, W. T.; te Meerman, G. J.; The, T. H.; de Leij, L. F. & van der Werf, T. S. (2001), 'Susceptibility to development of Mycobacterium ulcerans disease: review of possible risk factors.', *Trop Med Int Health* **6**(7), 554--562.
- Stienstra, Y.; van der Werf, T. S.; Oosterom, E.; Nolte, I. M.; van der Graaf, W. T. A.; Etuaful, S.; Raghunathan, P. L.; Whitney, E. A. S.; Ampadu, E. O.; Asamoah, K.; Klutse, E. Y.; te Meerman, G. J.; Tappero, J. W.; Ashford, D. A. & van der Steege, G. (2006), 'Susceptibility to Buruli ulcer is associated with the SLC11A1 (NRAMP1) D543N polymorphism.', *Genes Immun* **7**(3), 185--189.
- Stinear, T.; Davies, J. K.; Jenkin, G. A.; Hayman, J. A.; Oppedisano, F. & Johnson, P. D. R. (2000a), 'Identification of Mycobacterium ulcerans in the environment from regions in southeast Australia in which it is endemic with sequence capture-PCR', *Applied And Environmental Microbiology* **66**(8), 3206--3213.

- Stinear, T.; Ross, B. C.; Davies, J. K.; Marino, L.; Robins-Browne, R. M.; Oppedisano, F.; Sievers, A. & Johnson, P. D. R. (1999), 'Identification and characterization of IS2404 and IS2606: Two distinct repeated sequences for detection of *Mycobacterium ulcerans* by PCR', *Journal Of Clinical Microbiology* **37**(4), 1018--1023.
- Stinear, T. P.; Hong, H.; Frigui, W.; Pryor, M. J.; Brosch, R.; Garnier, T.; Leadlay, P. F. & Cole, S. T. (2005), 'Common evolutionary origin for the unstable virulence plasmid pMUM found in geographically diverse strains of *Mycobacterium ulcerans*.', *J Bacteriol* **187**(5), 1668--1676.
- Stinear, T. P.; Jenkin, G. A.; Johnson, P. D. & Davies, J. K. (2000b), 'Comparative genetic analysis of *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* reveals evidence of recent divergence.', *J Bacteriol* **182**(22), 6322--6330.
- Stinear, T. P.; Mve-Obiang, A.; Small, P. L. C.; Frigui, W.; Pryor, M. J.; Brosch, R.; Jenkin, G. A.; Johnson, P. D. R.; Davies, J. K.; Lee, R. E.; Adusumilli, S.; Garnier, T.; Haydock, S. F.; Leadlay, P. F. & Cole, S. T. (2004), 'Giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(5), 1345--1349.
- Stinear, T. P.; Pryor, M. J.; Porter, J. L. & Cole, S. T. (2005), 'Functional analysis and annotation of the virulence plasmid pMUM001 from *Mycobacterium ulcerans*.', *Microbiology* **151**(Pt 3), 683--692.
- Stinear, T. P.; Seemann, T.; Pidot, S.; Frigui, W.; Reysset, G.; Garnier, T.; Meurice, G.; Simon, D.; Bouchier, C.; Ma, L.; Tichit, M.; Porter, J. L.; Ryan, J.; Johnson, P. D. R.; Davies, J. K.; Jenkin, G. A.; Small, P. L. C.; Jones, L. M.; Tekaia, F.; Laval, F.; Daffe, M.; Parkhill, J. & Cole, S. T. (2007), 'Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer', *Genome Research* **17**(2), 192--200.
- Storey, M. V.; Winiecka-Krusnell, J.; Ashbolt, N. J. & Stenström, T.-A. (2004), 'The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoebae* and *Legionellae*.', *Scand J Infect Dis* **36**(9), 656--662.
- Stragier, P.; Ablordey, A.; Bayonne, L. M.; Lugor, Y. L.; Sindani, I. S.; Suykerbuyk, P.; Wabinga, H.; Meyers, W. M. & Portaels, F. (2006), 'Heterogeneity among *Mycobacterium ulcerans* isolates from Africa', *Emerging Infectious Diseases* **12**(5), 844--847.
- Stragier, P.; Ablordey, A.; Durnez, L. & Portaels, F. (2007), 'VNTR analysis differentiates *Mycobacterium ulcerans* and IS2404 positive mycobacteria', *Systematic And Applied Microbiology* **30**(7), 525--530.
- Strahl, E. D.; Gillaspay, G. E. & Falkinham, J. O. (2001), 'Fluorescent acid-fast microscopy for measuring phagocytosis of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* by *Tetrahymena pyriformis* and their intracellular growth.', *Appl Environ Microbiol* **67**(10), 4432--4439.
- Thomas, V.; Casson, N. & Greub, G. (2006a), 'Criblamydia sequanensis, a new intracellular Chlamydiales isolated from Seine river water using amoebal co-culture.', *Environ Microbiol* **8**(12), 2125--2135.
- Thomas, V.; Herrera-Rimann, K.; Blanc, D. S. & Greub, G. (2006b), 'Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network', *Applied And Environmental Microbiology* **72**(4), 2428--2438.
- Thomas, V.; Loret, J.-F.; Jousset, M. & Greub, G. (2008), 'Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a drinking water treatment plant.', *Environ Microbiol* **10**(10), 2728--2745.
- Thomas, V. & McDonnell, G. (2007), 'Relationship between mycobacteria and amoebae: ecological and epidemiological concerns', *Letters In Applied Microbiology* **45**(4), 349--357.
- Thorel, M. F.; Krichevsky, M. & Lévy-Frébault, V. V. (1990), 'Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov.', *Int J Syst Bacteriol* **40**(3), 254--260.
- Torrado, E.; Fraga, A. G.; Castro, A. G.; Stragier, P.; Meyers, W. M.; Portaels, F.; Silva, M. T. & Pedrosa, J. (2007), 'Evidence for an intramacrophage growth phase of *Mycobacterium ulcerans*', *Infection And Immunity* **75**(2), 977--987.
- Tortoli, E. (2006), 'The new mycobacteria: an update.', *FEMS Immunol Med Microbiol* **48**(2), 159--178.
- Trott, K. A.; Stacy, B. A.; Lifland, B. D.; Diggs, H. E.; Harland, R. M.; Khokha, M. K.; Grammer, T. C. & Parker,

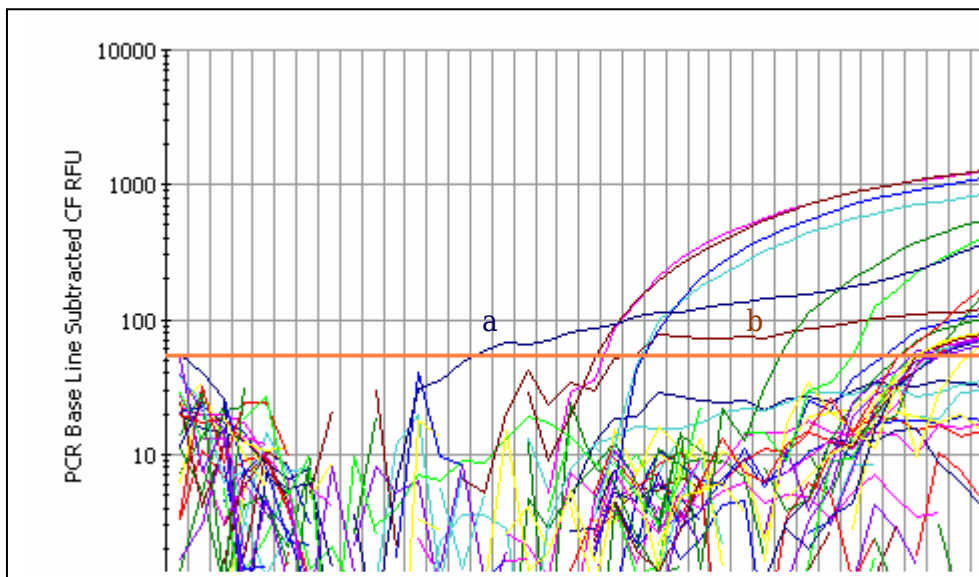
- J. M. (2004), 'Characterization of a Mycobacterium ulcerans-like infection in a colony of African tropical clawed frogs (*Xenopus tropicalis*).', *Comp Med* **54**(3), 309--317.
- Tsai, Y. L. & Olson, B. H. (1992), 'Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction.', *Appl Environ Microbiol* **58**(7), 2292--2295.
- Tsukamura, M., Nemoto, H. and Yugi, H. (1983), '*Mycobacterium porcinum* sp. nov., a porcine pathogen.' *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**,162-165.
- Ucko, M. & Colorni, A. (2005), 'Mycobacterium marinum infections in fish and humans in Israel.' *J Clin Microbiol* **43**(2), 892--895.
- Veitch, M. G.; Johnson, P. D.; Flood, P. E.; Leslie, D. E.; Street, A. C. & Hayman, J. A. (1997), 'A large localized outbreak of Mycobacterium ulcerans infection on a temperate southern Australian island.', *Epidemiol Infect* **119**(3), 313--318.
- Wagner, T.; Benbow, M. E.; Brenden, T. O.; Qi, J. & Johnson, R. C. (2008), 'Buruli ulcer disease prevalence in Benin, West Africa: associations with land use/cover and the identification of disease clusters', *International Journal Of Health Geographics* **7**, 25.
- Wallace, R. J. (1987), 'Nontuberculous mycobacteria and water: a love affair with increasing clinical importance.', *Infect Dis Clin North Am* **1**(3), 677--686.
- van der Werf, T. S.; Stienstra, Y.; Johnson, R. C.; Phillips, R.; Adjei, O.; Fleischer, B.; Wansbrough-Jones, M. H.; Johnson, P. D. R.; Portaels, F.; van der Graaf, W. T. A. & Asiedu, K. (2005), 'Mycobacterium ulcerans disease', *Bulletin Of The World Health Organization* **83**(10), 785--791.
- Weyers, W.; Weyers, I.; Bonczkowitz, M.; Mayser, P. & Schill, W. B. (1996), '[Skin infections caused by Mycobacterium gordonae. Case report and review of the literature]', *Hautarzt* **47**(10), 771--775.
- WHO (2008), Buruli ulcer disease., WHO, Geneva.
- Williamson, H. R.; Benbow, M. E.; Nguyen, K. D.; Beachboard, D. C.; Kimbirauskas, R. K.; McIntosh, M. D.; Quaye, C.; Ampadu, E. O.; Boakye, D.; Merritt, R. W. & Small, P. L. C. (2008), 'Distribution of Mycobacterium ulcerans in Buruli Ulcer Endemic and Non-Endemic Aquatic Sites in Ghana', *Plos Neglected Tropical Diseases* **2**(3), e205.
- Winiiecka-Krusnell, J.; Wreiber, K.; von Euler, A.; Engstrand, L. & Linder, E. (2002), 'Free-living amoebae promote growth and survival of Helicobacter pylori.', *Scand J Infect Dis* **34**(4), 253--256.
- Yip, M. J.; Porter, J. L.; Fyfe, J. A. M.; Lavender, C. J.; Portaels, F.; Rhodes, M.; Kator, H.; Colorni, A.; Jenkin, G. A. & Stinear, T. (2007), 'Evolution of Mycobacterium ulcerans and other mycolactone-producing mycobacteria from a common Mycobacterium marinum progenitor.', *J Bacteriol* **189**(5), 2021--2029.
- Yu, H. S.; Jeong, H. J.; Hong, Y.-C.; Seol, S.-Y.; Chung, D.-I. & Kong, H.-H. (2007), 'Natural occurrence of Mycobacterium as an endosymbiont of Acanthamoeba isolated from a contact lens storage case.', *Korean J Parasitol* **45**(1), 11--18.

VII Bijlagen

Bijlage 1. Overzicht staalname en gebruikte methodes



Bijlage 2. Fluorescentiesignalen van de amplificatie van IS2606



Fluorescentiesignalen van de amplificatie van IS2606. De horizontale oranje lijn is de drempelwaarde die de helft van het exponentieel verloop aangeeft. Signalen met een duidelijk exponentieel verloop zijn normale signalen. Het DNA extract (afkomstig van een amoebencultuur) met het abnormale signaal beschreven in Resultaten§4.3 wordt voorgesteld door de bruine lijn, aangeduid met "b". Het abnormaal signaal van de positieve extractie controle wordt voorgesteld met een blauwe lijn en is aangeduid met "a". Vermits de positieve extractie controle zeker IS2606 DNA bevat en de vorm van dit signaal gelijk is op die van staal "b", gaan we ervan uit dat staal "b" ook IS2606 bevat. Het viel helaas buiten het bestek van deze thesis om de test te herhalen.