

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher

Vergleichende Evaluation von real-time PCR-Assays für den Nachweis von *Aliarcobacter butzleri* als Testvergleich ohne Goldstandard

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Ramona Binder
aus Karl-Marx-Stadt, jetzt Chemnitz

Hamburg 2023

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 14.02.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Michael Ramharter

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Holger Rohde

Inhaltsverzeichnis

1.	Originalarbeit der Publikationspromotion.....	4
2.	Zusammenfassende Darstellung der Publikation.....	17
2.1	Einleitung.....	17
2.2	Material und Methoden.....	18
2.2.1	Proben für Testvergleich, Ein- und Ausschlusskriterien.....	18
2.2.2	Extraktion und Lagerung der Nukleinsäuren.....	19
2.2.3	Vergleichende real-time PCR-Assay-Untersuchung zum Nachweis von <i>A. butzleri</i>	19
2.2.4	Bestimmung der diagnostischen Genauigkeit, Übereinstimmung und Vergleich der erhaltenen Zyklusgrenzwerte (Ct).....	20
2.2.5	Ethik.....	21
2.3	Ergebnisse.....	21
2.3.1	Qualitative und quantitative Ergebnisse der gespikten Probenmaterialien.....	21
2.3.2	Berechnung der Sensitivität und Spezifität der Tests auf Grundlage der LCA, Vergleich der untersuchten Assays und adjustierte Prävalenzschätzung.....	21
2.3.3	Vergleich der gemessenen Ct-Werte.....	22
2.4	Diskussion.....	22
2.4.1	Bewertung.....	22
2.4.2	Limitationen.....	24
2.4.3	Schlussfolgerungen.....	25
3.	Zusammenfassung.....	27
3.1	Deutsche Zusammenfassung.....	27
3.2	Englische Zusammenfassung.....	28
4.	Abkürzungsverzeichnis.....	29
5.	Literaturverzeichnis.....	30
6.	Erklärung des Eigenanteils.....	36
7.	Danksagung.....	37
8.	Lebenslauf.....	38
9.	Eidesstattliche Versicherung.....	39

1. Originalarbeit der Publikationspromotion



Article

Comparison of the Diagnostic Accuracy of Three Real-Time PCR Assays for the Detection of *Arcobacter butzleri* in Human Stool Samples Targeting Different Genes in a Test Comparison without a Reference Standard

Ramona Binder ¹, Andreas Hahn ², Kirsten Alexandra Eberhardt ^{3,4}, Ralf Matthias Hagen ⁵, Holger Rohde ⁶, Ulrike Loderstädt ⁷, Torsten Feldt ⁸, Fred Stephen Sarfo ^{9,10}, Veronica Di Cristanziano ¹¹, Sascha Kahlfuss ^{12,13,14,15}, Hagen Frickmann ^{2,16,†} and Andreas Erich Zautner ^{12,13,*,†}



Citation: Binder, R.; Hahn, A.; Eberhardt, K.A.; Hagen, R.M.; Rohde, H.; Loderstädt, U.; Feldt, T.; Sarfo, F.S.; Di Cristanziano, V.; Kahlfuss, S.; et al. Comparison of the Diagnostic Accuracy of Three Real-Time PCR Assays for the Detection of *Arcobacter butzleri* in Human Stool Samples Targeting Different Genes in a Test Comparison without a Reference Standard. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1313. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051313>

Academic Editor: Adolfo J. Martinez-Rodriguez

Received: 3 April 2023

Revised: 13 May 2023

Accepted: 15 May 2023

Published: 17 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Laboratory Department, Bundeswehr Hospital Hamburg, 20359 Hamburg, Germany; ramonabinder@bundeswehr.org
 - ² Institute for Medical Microbiology, Virology and Hygiene, University Medicine Rostock, 18057 Rostock, Germany; andreas.hahn@uni-rostock.de (A.H.)
 - ³ Department of Tropical Medicine, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine & I. Department of Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20359 Hamburg, Germany; k.eberhardt@bnitm.de
 - ⁴ Division of Hygiene and Infectious Diseases, Institute of Hygiene and Environment, 20539 Hamburg, Germany
 - ⁵ Department of Microbiology and Hospital Hygiene, Bundeswehr Central Hospital Koblenz, 56070 Koblenz, Germany; ralfmatthias.hagen@bundeswehr.org
 - ⁶ Institute of Medical Microbiology, Virology and Hygiene, University Medical Center Hamburg-Eppendorf (UKE), 20251 Hamburg, Germany; rohde@uke.de
 - ⁷ Department of Hospital Hygiene & Infectious Diseases, University Medicine Göttingen, 37075 Göttingen, Germany; ulrike.loderstaedt1@med.uni-goettingen.de
 - ⁸ Department of Gastroenterology, Hepatology and Infectious Diseases, University Medical Center Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany; torsten.feldt@med.uni-duesseldorf.de
 - ⁹ Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi 00233, Ghana; stephensarfo78@gmail.com
 - ¹⁰ Department of Medicine, Komfo Anokye Teaching Hospital, Kumasi 00233, Ghana
 - ¹¹ Institute of Virology, Faculty of Medicine, University Hospital of Cologne, University of Cologne, 50935 Cologne, Germany; veronica.di-cristanziano@uk-koeln.de
 - ¹² Institute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, Medical Faculty, Otto-von-Guericke-University Magdeburg, 39120 Magdeburg, Germany; sascha.kahlfuss@med.ovgu.de
 - ¹³ CHAMP—Center for Health and Medical Prevention, Otto-von-Guericke-University Magdeburg, 39120 Magdeburg, Germany
 - ¹⁴ Institute of Molecular and Clinical Immunology, Medical Faculty, Otto-von-Guericke University Magdeburg, 39104 Magdeburg, Germany
 - ¹⁵ Health Campus Immunology, Infectiology and Inflammation (GCI), Medical Faculty, Otto-von-Guericke University Magdeburg, 39104 Magdeburg, Germany
 - ¹⁶ Department of Microbiology and Hospital Hygiene, Bundeswehr Hospital Hamburg, 20359 Hamburg, Germany
- * Correspondence: azautne@gwdg.de
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Potential etiological relevance for gastroenteric disorders including diarrhea has been assigned to *Arcobacter butzleri*. However, standard routine diagnostic algorithms for stool samples of patients with diarrhea are rarely adapted to the detection of this pathogen and so, *A. butzleri* is likely to go undetected unless it is specifically addressed, e.g., by applying pathogen-specific molecular diagnostic approaches. In the study presented here, we compared three real-time PCR assays targeting the genes *hsp60*, *rpoB/C* (both hybridization probe assays) and *gyrA* (fluorescence resonance energy transfer assay) of *A. butzleri* in a test comparison without a reference standard using a stool sample collection with a high pretest probability from the Ghanaian endemicity setting. Latent class analysis was applied with the PCR results obtained with a collection of 1495 stool samples showing no signs of PCR inhibition to assess the real-time PCR assays' diagnostic accuracy. Calculated sensitivity and specificity were 93.0% and 96.9% for the *hsp60*-PCR, 100% and 98.2% for the *rpoB/C*-PCR, as well as 12.7% and 99.8% for the *gyrA*-PCR, respectively. The calculated *A. butzleri* prevalence within

the assessed Ghanaian population was 14.7%. As indicated by test results obtained with high-titer spiked samples, cross-reactions of the *hsp60*-assay and *rpoB/C*-assay with phylogenetically related species such as *A. cryaerophilus* can occur but are less likely with phylogenetically more distant species like, e.g., *A. lanthieri*. In conclusion, the *rpoB/C*-assay showed the most promising performance characteristics as the only assay with sensitivity >95%, albeit associated with a broad 95%-confidence interval. In addition, this assay showed still-acceptable specificity of >98% in spite of the known cross-reactivity with phylogenetically closely related species such as *A. cryaerophilus*. If higher certainty is desired, the *gyrA*-assay with specificity close to 100% can be applied for confirmation testing with samples showing positive *rpoB/C*-PCR results. However, in case of a negative result in the *gyrA*-assay, this cannot reliably exclude the detection of *A. butzleri* in the *rpoB/C*-assay due to the *gyrA*-assay's very low sensitivity.

Keywords: *Arcobacter*; *Aliarcobacter*; real-time PCR; evaluation; test comparison; molecular diagnostics

1. Introduction

Arcobacter butzleri (homotypic synonym "*Aliarcobacter butzleri*"), formerly addressed as *Campylobacter butzleri* and first described in 1991, is a facultatively pathogenic bacterium from the order Campylobacterales and the family Arcobacteraceae [1–5]. Moreover, in 1991, the genus name *Arcobacter* was proposed [6]. *Arcobacter* spp. are phylogenetically closely related to *Campylobacter* spp. [7]. Nevertheless, the phenotypic characteristics of the genera are partly different [8]. In human patients, *A. butzleri* has been associated with partly severe infections comprising diarrhea including travelers' diarrhea, enteritis, gangrenous appendicitis, peritonitis, endocarditis and bacteremia and accordingly, it has been regarded as an emerging pathogen since 2002 [9–13]. Nosocomial transmission has been reported [14].

Next to *A. butzleri*, the likely importance of *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* and other species for human enteric disease has been suggested, mostly due to epidemiological associations or based on case reports [12,15–18]. Other species, such as, e.g., *A. lanthieri*, have been primarily associated with livestock [19], although virulence factors with likely relevance for human disease have been found in their genomes as well [20–22]. Altogether, the etiological relevance of *A. butzleri* is considered to be the best established [15,16]. Cell invasion, induction of immune responses and toxin production have been associated with its pathogenic potential [16,18,23]. As expected, due to phylogenetic relatedness, various virulence genes are homologous to those in *Campylobacter* spp. [24]. In particular, invasive and adhesive properties have been demonstrated [25]. Selection of the microorganism under antibiotic pressure can be facilitated by its pronounced resistance to antimicrobial drugs or even multidrug-resistance [16,26]. In a recent meta-analysis on *Arcobacter* spp. [27], high minimum inhibitory concentrations, suggestive of a lack of antimicrobial susceptibility, were recorded, particularly for beta-lactams with up-to 99.2% and 97.4% for penicillin derivatives and cephalosporines, respectively, followed by macrolides with up-to 39.8%, fluoroquinolones with up-to 14%, aminoglycosides with up-to 12.9% and tetracyclines with up-to 7.1%. Further, sequencing approaches have shown a high diversity of sequence types, mostly without clear-cut associations to specific hosts or geographic regions [24].

Livestock, including poultry and pigs, has been identified as a reservoir of *A. butzleri*, and raw meat products, as well as contaminated water, are of relevance for the pathogen's transmission [15,24,28–31]. Accordingly, *A. butzleri*-associated disease is considered zoonotic [32]. Meat contamination is assumed to be caused by spillage of gastrointestinal fluids from animals during the slaughtering process [12]. Adverse environmental conditions such as food processing and storage can be survived by the microorganism, supporting its spread to human individuals [16].

Culture-based isolation and differentiation of *A. butzleri* is still not a standardized routine procedure in diagnostic laboratories assessing human sample materials [15,32]. The lack of standardized diagnosis has also been blamed for the lack of reports of *A. butzleri*-

associated disease in regions where the microorganisms are known to be highly prevalent like, e.g., in Nigeria [33]. Though cultural growth of *Arcobacter* spp. in microaerobic or aerobic atmosphere is feasible, and—other than *Campylobacter* spp.—the microorganisms even grow at low temperature of 15 °C, common growth protocols suggest enrichment steps, i.e., use of selective broths and agars to suppress concomitant bacterial flora, as well as incubation times of 4–5 days [13,23,34]. *A. butzleri* also grows on standard agars such as blood agar, chocolate agar and MacConkey agar under standard conditions such as a temperature of 37 °C and an atmosphere enriched with 5% CO₂, with colonies showing positive results in cytochrome oxidase and motility testing [13]. Biochemical differentiation is challenging [12,13], and the reliability of matrix-assisted laser-desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI) largely depends on the quality of the underlying database as reported elsewhere [18]. Accordingly, *A. butzleri*-associated gastroenteritis is assumed to frequently go undetected, making an estimation of the role of this microorganism in infectious gastroenteritis challenging [12]. In line with this, a previously reported association of *Arcobacter* spp.-isolations with 0.11% to 1.25% of diarrhea cases might considerably underestimate the microorganisms' true prevalence [18].

Considering the challenges of traditional culture-based *Arcobacter* spp.-detection and identification in the diagnostic routine setting [12,13,15,18,23,32–34], molecular diagnostic approaches based on PCR or real-time PCR with or without subsequent sequence analysis were established [13,35]. Of note, however, early *Arcobacter* spp.-specific PCR assays targeting genes such as *gyrA* or the 16S and 23S ribosomal RNA genes showed restricted diagnostic accuracy including cross-reactions with non-target species [35]. For various *Arcobacter* spp., including *A. butzleri*, fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based and hybridization probe-based real-time PCR assays have been introduced, established and applied for human diagnostic, agricultural and environmental use [17,36–47]; however, the validation studies were usually based on quite limited sample counts.

In the study presented here, the aim was to contribute to available evidence on the diagnostic accuracy of selected *A. butzleri*-specific real-time PCR assays [36–38] based on a test comparison without a reference standard [48], applying latent class analysis [49] and using a sample collection with unknown *A. butzleri* prevalence but expected high pretest probability due to a known high local abundance of this microorganism [26].

2. Materials and Methods

2.1. Residual Volumes of Sample Materials Used for the Test Comparison, Inclusion and Exclusion Criteria

The test comparison of the three assessed real-time PCR assays for the detection of *A. butzleri* in human stool samples was conducted in two steps. In a first step, 65 stool samples were spiked to high final concentrations of about 10⁷ colony-forming-units (cfu) per µL with clinical and environmental *A. butzleri* strains (*n* = 30), *A. cryaerophilus* strains (*n* = 22), livestock-associated *A. lanthieri* strains (*n* = 12) [19] and a single *Campylobacter coli* strain as an outlier from a strain collection at the University of Magdeburg, Germany. Those spiked samples with high pathogen density were used to assess the general applicability of the compared assays, applying samples with known expected results in the first but superficial proof-of-principle. Dilution steps were not included in the proof-of-principle spiking experiments; respective dilution series to identify the applied real-time PCRs' technical detection thresholds were performed with standardized positive control plasmids as described below instead.

In a second step, residual volumes of nucleic acid extraction eluates of stool samples taken from Ghanaian individuals with an expected high pretest probability of being colonized or infected with *A. butzleri* were included in a test comparison without a reference standard. The high pretest probability was assumed due to a known high local abundance of the microorganism in Western Africa [26,33]. Results of other diagnostic tests targeting this parameter, such as, e.g., cultural growth, were not available for these materials. The sample collection comprised a total of 1570 samples collected in the course of both a study

on Ghanaian HIV patients [50,51] and an assessment of the epidemiology of gastroenteric pathogens in Ghanaian children <2 years of age about 10 years in the past (unpublished).

All samples containing sufficient material for all compared test assays were included in the assessment. Samples showing sample inhibition in the inhibition control PCR as detailed below were subsequently excluded from the calculation of diagnostic accuracy parameters. In line with the ethical requirements for this test assessment as detailed below, complete anonymization of the samples was required for the analysis; thus, patient specific details such as age, sex or clinical symptoms cannot be provided for this study. This is an admitted deviation from the Standards of Reporting Diagnostic Accuracy (STARD) criteria [52].

2.2. Nucleic Acid Extraction and Storage

Nucleic acids had been extracted, applying the QIAamp stool DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) as described by the manufacturer and stored at -80°C until application for the test comparison.

2.3. Real-Time PCR Assays Comparatively Applied for the Detection of *Arcobacter butzleri*

The compared assays comprised two hybridization probe-based real-time PCRs targeting the *rpoB/C* gene [37] and the *hsp60* gene [38] of *A. butzleri* as well as a FRET-based real-time PCR designed to target the *gyrA* gene of *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *Arcobacter cibarius* and *Arcobacter nitrofigilis* at different distinguishable melting temperatures [36]. The protocols were adapted to be run on Corbett Q cyclers (Qiagen, Hilden, Germany), resulting in minor modifications from the originally published run conditions [36–38]. Details on the applied oligonucleotides, reaction chemistry and run protocols are provided in Appendix A, Tables A1–A3. A PCR-grade water-based negative control and a plasmid-based positive control were included in each run. The sequence insert of the positive control plasmid, which had been inserted in a pEX A128 vector backbone (eurofins Genomics, Luxemburg), is shown in Appendix A, Table A3. Based on dilution series of the positive control plasmid, technical detection thresholds of 37.1 copies per μL for the *hsp60* and the *gyrA* PCR as well as of 370.5 copies per μL for the *rpoB/C* PCR were estimated, applying the internet-based software “Calculator for determining the number of copies of a template” (URI Genomics and Sequencing Center, <https://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>, last accessed on 8 March 2023). Sample inhibition was confirmed or ruled out, applying a previously described real-time PCR targeting a Phocid herpes virus (PhHV) sequence as described elsewhere [53].

2.4. Diagnostic Accuracy Estimation, Agreement and Comparison of Obtained Cycle Threshold (Ct) Values

In the first step of the evaluation, the spiked stool samples were used to assess the general applicability of the compared real-time PCR assays. Accordingly, obtained cycle threshold (Ct) values were just descriptively recorded and assessed. Next to this, this step was conducted to identify the *A. butzleri*- and *A. cryaerophilus*-specific melting temperature for the adapted run conditions of the *gyrA*-PCR, in addition to the use of the positive control plasmid containing an *A. butzleri*-specific *gyrA*-sequence for this purpose.

In the second step, latent class analysis (LCA) [48,49,54] was applied to estimate the diagnostic accuracy—i.e., sensitivity and specificity for the detection of *A. butzleri*—of the compared real-time PCR assays. In short, LCA is a variant of structural equation models. Thereby, a latent non-observable variable, i.e., the “true” infection or colonization status of the tested individuals with *A. butzleri*, is estimated over directly observed variables, i.e., the recorded test results for different *A. butzleri*-specific target sequences [48,49,54]. Thereby, only real-time PCR signals in the *gyrA*-PCR with *A. butzleri*-specific melting temperature were counted as *A. butzleri* positive in this assay, while *gyrA*-PCR signals with melting temperatures suggestive of *A. cryaerophilus* or other microorganisms were considered as *gyrA*-negative for the target pathogen *A. butzleri*. As the *gyrA* sequence is highly under mutation pressure both naturally and under quinolone treatment, a melting temperature

deviation from the expected melting temperature within the ± 1 °C range was still accepted as species specific. In addition, LCA was applied to perform a diagnostic accuracy-adjusted prevalence estimation for *A. butzleri* in the assessed sample population. In line with the suggestions by Landis and Koch [55], Fleiss' kappa was calculated for the agreement between the compared real-time PCR assays and interpreted as described in [55]. In addition, measured cycle threshold (Ct) values were recorded and descriptively compared. Typical sigmoid-shaped real-time amplification curves were considered as positive signals without specific Ct value cut-offs for this assessment. All statistical assessments were conducted with the software Stata/IC 15.1 for Mac 64-bit Intel (College Station, TX, USA).

2.5. Ethics

Ethical clearance for the anonymized use of residual volumes of sample materials for test comparison purposes was provided by the medical association of Hamburg, Germany, (reference number: WF-011/19, obtained on 11 March 2019) without further requirement for informed consent.

3. Results

3.1. Quantitative and Qualitative Results Obtained with Spiked Sample Materials

All applied *A. butzleri*-specific real-time PCRs correctly identified all 30 stool samples spiked with *A. butzleri* at high titer as described above. Cross-reactions with high-titer *A. cryaerophilus*-spiked stool samples were observed in 6 out of 22 cases for the *hsp60*-PCR and in 16 out of 22 cases for the *rpoB/C*-assay. For the *hsp60*-PCR, the mean Ct-value difference between *A. butzleri*-spiked samples and *A. cryaerophilus*-spiked samples was 14.9; for the *rpoB/C*-PCR, it was 4.5 Ct steps. The *gyrA*-assay showed an expected reaction with 21 out of 22 *A. cryaerophilus*-spiked samples, albeit with a clearly discriminable melting-temperature compared to *A. butzleri*-spiked samples. Of note, a moderate Ct-value difference of 7.3 was seen for the *gyrA*-PCR in comparison of *A. butzleri*- and *A. cryaerophilus*-spiked reference samples as well. All 12 assessed samples spiked with *A. lanthieri* showed negative results in the three assessed real-time PCR assays. Details are provided in Table 1 and its footnote. The single included "outstander" sample spiked with *C. coli* showed a signal in the *rpoB/C*-PCR only at a very high Ct value of 35.0, i.e., 18.6 Ct steps after the mean value of the samples spiked with *A. butzleri*.

Table 1. Positive real-time PCR signals in stool samples spiked with either *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* or *A. lanthieri*.

rReal-Time PCR Target	<i>gyrA</i>	<i>rpoB/C</i>	<i>hsp60</i>
Number and percentage of positive signals with samples spiked with <i>A. butzleri</i> , n/n (%)	30/30 (100%)	30/30 (100%)	30/30 (100%)
Ct values measured with samples spiked with <i>A. butzleri</i> , mean (\pm SD)	22.2 (\pm 4.6)	16.4 (\pm 3.8)	16.6 (\pm 3.4)
Melting temperature in °C (\pm SD) with <i>A. butzleri</i>	65.7 (\pm <0.1)	n.a.	n.a.
Number and percentage of positive signals with samples spiked with <i>A. cryaerophilus</i> , n/n (%)	0/22 (0%) ^o	16/22 (72.7%)	6/22 (27.3%)
Ct values measured with samples spiked with <i>A. cryaerophilus</i> , mean (\pm SD)	n.a.	20.9 (\pm 2.7)	31.5 (\pm 0.6)
Melting temperature in °C (\pm SD) with <i>A. cryaerophilus</i>	60.5 (\pm 0.3)	n.a.	n.a.
Number and percentage of positive signals with samples spiked with <i>A. lanthieri</i> , n/n (%)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0/12 (0%)
Ct values measured with samples spiked with <i>A. lanthieri</i> , mean (\pm SD)	n.a.	n.a.	n.a.
Melting temperature in °C (\pm SD) with <i>A. lanthieri</i>	n.a.	n.a.	n.a.
Significance level P for differences of the measured Ct values of <i>A. butzleri</i> and <i>A. cryaerophilus</i> *	n.e.	0.0003	<0.0001

n = number; % = percent; Ct = cycle threshold; n.e. = not estimable; n.a. = not applicable; SD = standard deviation.
^{*} Calculation based on Mann-Whitney U testing. ^o Twenty-one out of twenty-two (95.5%) samples were positive with clearly distinguishable melting temperature (see main text) and a significance ($p = <0.0001$) for higher Ct values of 29.5 (\pm 4.1) compared to the samples spiked with *A. butzleri*.

3.2. Sensitivity and Specificity of the Assays as Calculated Based on Latent Class Analysis (LCA), Agreement between the Compared Assays and Accuracy-Adjusted Prevalence Estimations

For the LCA-based assessment of diagnostic accuracy, 75 samples showing PCR inhibition were excluded, resulting in a total number of $n = 1495$ included residual volumes of Ghanaian stool sample materials. As detailed in Table 2, the number of positive PCR signals within these included samples ranged from $n = 30$, as recorded with the *gyrA*-PCR, to $n = 245$, as recorded with the *hsp60*-PCR. Focusing on diagnostic accuracy, calculated sensitivity showed a broad spectrum ranging from 12.7% to 100% with *rpoB/C*-PCR, *hsp60*-PCR and *gyrA*-PCR in declining order of sensitivity. Calculated sensitivity >95% was observed for the *rpoB/C*-PCR only, albeit with a broad 95%-confidence interval. The calculated specificity values were much closer together, ranging from 96.8% to 98.8% with *gyrA*-PCR, *rpoB/C*-PCR and *hsp60*-PCR in declining order of specificity. The agreement kappa calculated for the results of all three compared PCRs was only moderate, as shown in Table 2, and mainly driven by the influence of the *gyrA*-PCR results. If only the *hsp60*-PCR and the *rpoB/C*-PCR were compared, the agreement kappa would rise to almost perfect with a value (95%-confidence interval) of 0.812 (0.771–0.852) (Table 2). Concordance and discordance between the individual real-time PCR assays are visualized in Table 3. Based on the LCA-assessments, a prevalence of 14.8% colonization or infection with *A. butzleri* was calculated for the assessed Ghanaian stool sample collection (Table 2).

Table 2. Agreement kappa between the three compared real-time PCR assays targeting *A. butzleri* as well as sensitivity, specificity and accuracy-adjusted prevalence as calculated with latent class analysis (LCA) based on the assessment of 1495 samples, not showing PCR inhibition with high pre-test probability.

Assay	Total Number (n) of Included Samples	Positives (%)	Sensitivity (0.95 CI)	Specificity (0.95 CI)	Kappa (0.95 CI)
<i>gyrA</i>	1495	30 (1.91)	0.1267 (0.0876, 0.1797)	0.9984 (0.9936, 0.9996)	0.436 (0.403, 0.472)
<i>rpoB/C</i>	1495	244 (16.32)	1 (0, 1)	0.9818 (0.9499, 0.9935)	
<i>hsp60</i>	1495	245 (16.39)	0.9298 (0.7513, 0.9831)	0.9688 (0.9576, 0.9771)	
Prevalence (0.95 CI)	0.1477 (0.1258, 0.1726)				

CI = confidence interval.

Table 3. Cross-table detailing mismatches between the real-time PCR assays targeting *A. butzleri*.

		<i>gyrA</i>		<i>rpoB/C</i>		<i>hsp60</i>	
		Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive
<i>gyrA</i>	Negative	1465					
	Positive	0	30				
<i>rpoB/C</i>	Negative	1249	2	1251			
	Positive	216	28	0	244		
<i>hsp60</i>	Negative	1246	4	1212	38	1250	
	Positive	219	26	39	206	0	245

Green = matching results; Red = mismatching results; Black = not filled in to avoid repetition.

3.3. Comparison of the Recorded Cycle Threshold (Ct) Values

Recorded median cycle threshold values ranged from 32 to 40.5 over all three assessed real-time PCRs for the 1495 samples without recorded PCR inhibition included in the LCA assessment and excluding the above-mentioned *gyrA*-PCR results with melting temperatures non-indicative for *A. butzleri*. Thereby, *hsp60*-PCR, *rpoB/C*-PCR and *gyrA*-PCR were arranged in inclining order of median Ct values (Table 4). While the measured median Ct values of *hsp60*-PCR and *rpoB/C*-PCR were quite similar, the values obtained with the *gyrA*-PCR were on average 6 to 9 Ct steps higher.

Table 4. Recorded cycle threshold (Ct) values of the real-time PCRs targeting *A. butzleri*.

	<i>n</i>	Mean (SD)	Median (q25, q75)
<i>gyrA</i>	30	39.83 (2.41)	40.5 (39, 41)
<i>rpoB/C</i>	244	33.55 (1.77)	34 (33, 35)
<i>hsp60</i>	245	31.86 (1.58)	32 (31, 33)

SD = standard deviation; q25 = 25%-quartile; q75 = 75%-quartile.

4. Discussion

Considering the yet-poor standardization of the diagnosis of *Arcobacter butzleri* in human stool samples in the routine diagnostic setting, the study was conducted to comparatively assess the diagnostic accuracy of three published real-time PCR assays with different target genes in a latent class analysis (LCA)-based test comparison without a reference standard using a sample collection with high pretest probability. The assessment led to a number of results.

First, the initial assessment with stool samples spiked at high titers with either *A. butzleri* or the phylogenetically closely related *A. cryaerophilus* indicated that all assessed real-time PCR assays are not perfectly specific for *A. butzleri* but have the potential of cross-reaction with phylogenetically related *Arcobacter* species. The lack of positive real-time PCR signals with samples spiked with 12 *A. lanthieri* strains at least indicates that such cross-reactions do not necessarily occur with all representatives of the genus. The observed cross-reaction of the *rpoB*-assay with the single “outstander” sample, which was high titer-spiked with *Campylobacter coli*, was considered as hardly relevant for the diagnostic situation due to the extraordinarily large associated Ct value shift. While the reaction with *A. cryaerophilus* was expected for the *gyrA*-assay due to its design [36] and could be easily discriminated from reactions with *A. butzleri* due to distinct melting temperatures, such a discrimination was unfeasible for the hybridization probe-based *rpoB/C*-assay and *hsp60*-assay. However, Ct-values shifts of 14.9 when comparing *A. butzleri*-spiked samples and *A. cryaerophilus*-spiked samples in the *hsp60*-PCR, and of 4.5 when comparing them in the *rpoB/C*-PCR, indicated base-mismatching-associated reduced likeliness of cross-reaction with *A. cryaerophilus*. This might result in lower susceptibility of the hybridization probe assays to non-specific reactions in case of use with clinical samples without spiking-associated exorbitantly high concentrations of pathogen DNA. Nevertheless, the results confirm the previously described challenges regarding the design of PCR assays with reliable selectivity for *A. butzleri* [35].

Second, LCA-based prevalence estimation of 14.7% *A. butzleri*-positive cases among the assessed Ghanaian stool samples confirmed the study’s assumption that the chosen specimen collection was associated with high pre-test probability. This finding matches previous reports on *A. butzleri* prevalence rates in Ghanaian livestock being even higher than *Campylobacter* spp.-prevalence rates [56] next to reports on high enteric infection and colonization rates with bacterial pathogens in Ghanaian individuals [57,58] and on high *A. butzleri*-prevalence rates in Western African Nigeria [33]. In line with the ethical clearance of the here-presented study, the residual volumes of the samples were completely anonymously assessed; thus, no statements on epidemiological features such as age, sex and symptom associations can be provided. As stated above, this design is an admitted deviation from STARD criteria [52]. However, it is nevertheless in line with diagnostic routine conditions, despite the long storage of extracted DNA, because as-good-as-possible diagnostic accuracy for the detection of the target pathogen is required irrespective of the epidemiological background.

Third, and in line with previous findings [35], the LCA-assessment indicated considerable difference regarding the diagnostic accuracy of the assessed three published real-time PCR assays for the detection of *A. butzleri* [36–38]. The FRET-assay targeting the *gyrA* gene [36] showed the best specificity of close to 100%, albeit for the price of a very low sensitivity of less than 15%. Considering the high Ct values measured for the *gyrA*-PCR-positive Ghanaian sample materials, it is likely that target DNA quantities close

to the PCR's detection threshold have been the reason for the poor sensitivity result. A 10-fold higher detection threshold observed with the dilution series of the positive control plasmid compared to the *hsp60*-assay and the *rpoB/C*-assay as described above also speaks in favor of this conclusion. The hybridization probe-based *hsp60*-assay showed intermediate sensitivity of only slightly less than 95% but the comparably worst specificity of less than 97%. The latter is also the reason for the calculated sensitivity being lower than the calculated sensitivity of the *rpoB/C*-assay, although more positive results were obtained with the *hsp60*-assay from the sample collection. Focusing on the observed higher likelihood of the *rpoB/C*-assay to cross-react with *A. cryaerophilus*-spiked samples compared to the *hsp60*-assay, the latter's worse specificity might be considered surprising. However, the melting curve analysis of the non-*A. butzleri*-associated positive results in the *gyrA*-assay indicated a very low prevalence of only six samples positive for *A. cryaerophilus*, of which four showed negative reactions in the *hsp60*-assay. Due to the quantitatively low relevance of *A. cryaerophilus* as a potentially cross-reacting agent in the Ghanaian sample collection, its effect on the diagnostic accuracy estimations has most certainly been negligible. The *rpoB/C*-assay was the only assay with a calculated sensitivity of more than 95%, at least if the uncertainty due to the broad 95%-confidence interval is accepted, associated with a still-acceptable specificity of slightly more than 98%. In spite of the large confidence interval of the *rpoB/C*-PCR's estimated sensitivity, the true sensitivity of the assay is nevertheless likely to be actually high due to the observed combination of (a) a high absolute number of positive PCR signals; (b) the almost perfect agreement of its results with the results of the *hsp60*-assay, which showed sensitivity only slightly lower than 95%; and (c) the quite-acceptable specificity. The *rpoB/C*-assay's relatively good specificity may seem surprising considering the high rate of observed matching between positive *rpoB/C*-PCR results and positive *gyrA*-PCR results, with melting curves indicative of non-*A. butzleri* DNA. However, the observed non-*A. butzleri*-specific melting curves may have been due to co-colonization of the stool donors' gut with both *A. butzleri* and microorganisms with DNA more readily reacting with the *gyrA*-assay and so, it cannot be assumed for certain that the associated *rpoB/C*-PCR results must have been false positive in all these instances. The same applies to positive *hsp60*-PCR results in concordance with non-*A. butzleri*-specific positive *gyrA*-PCR signals. This co-colonization hypothesis is supported by the finding of quite-similar mean Ct values in *hsp60*-PCR and *rpoB/C*-PCR, respectively, irrespective of the observation of *A. butzleri*-specific or non-*A. butzleri*-specific melting temperatures in the *gyrA*-PCR. In contrast, the broad spectrum of observed melting temperatures in the case of non-*A. butzleri*-specific positive *gyrA*-PCR signals indicates that several phylogenetically related non-target microorganisms potentially associated with cross-reactivity were abundant in the sample collection.

This study has a number of limitations. First, a culture-based reference standard for the test comparison was not available. Respective attempts were unfeasible due to the retrospective design of the study. However, due to the lack of standardization regarding the cultural growth-based diagnosis of *A. butzleri*, uncertainties regarding the sensitivity and specificity of such an approach, even from fresh sample materials in the case of a prospective study design, would have limited its value as a reliable reference standard for the test comparison. Second, the choice of microorganisms used for the initial spiking experiments was restricted by the availability within the research group. However, the spiking approach was considered as no more than an initial proof-of-principle, while the main study was based upon the LCA approach. Third, lacking funding of this investigator-initiated investigation made sequencing-based confirmatory testing from all obtained PCR amplicons unfeasible; thus, LCA was applied for the diagnostic accuracy estimation. Due to this lack of a sequencing option, unfortunately, *gyrA* PCR signals with melting temperatures different from the expected values for *A. butzleri* and *A. cryaerophilus* could not be resolved. Fourth, and as repeatedly stated above, the ethical requirement of thorough anonymization for the test comparison made any comparison of *A. butzleri* detections, both qualitatively and with focus on recorded Ct values, with clinical symptoms of the assessed individuals

unfeasible. Future studies should be conducted in order to address this highly relevant issue and to estimate the clinical relevance of such real-time PCR findings. Fifth, and as an intrinsic limitation of the chosen mathematic approach, the principle of LCA implies that the calculated diagnostic accuracy does not necessarily refer specifically to *A. butzleri* but to a meta-structure sharing genetic elements detected by the three compared assays. This might as well mean a combination of *A. butzleri* and other phylogenetically closely related microorganisms abundant in the assessed Ghanaian stool samples. The observation of potential cross-reactivity within the *Arcobacter*/*Aliarcobacter* genus described in this study makes this option rather likely. Accordingly, LCA can help to estimate prevalence rates on a population level but cannot decide on the correctness of an individual PCR result.

5. Conclusions

In conclusion, imperfect diagnostic accuracy was observed for all assessed real-time PCR assays for the detection of *A. butzleri*. In comparison, the *rpoB*/C-assay showed the best performance characteristics, with sensitivity >95%, if residual uncertainty due to an observed broad 95% confidence interval is accepted, and with specificity >98%. Of note, the assay might be less reliable in settings where the discrimination of *A. butzleri* and *A. cryaerophilus* is of importance, e.g., due to relevant prevalence of the latter. For confirmation testing in cases of positive results obtained with the *rpoB*/C-based screening assay, the application of the highly specific *gyrA*-assay may be considered. In the case of a matching positive result with an *A. butzleri*-specific melting temperature, the diagnosis of *A. butzleri* can be considered as confirmed with high reliability. In the case of a negative *gyrA*-PCR result, however, the diagnosis of *A. butzleri* is not excluded due to the *gyrA*-assay's low sensitivity. Finally, due to the observed high prevalence of *A. butzleri* in Ghanaian stool samples, future studies on its etiological relevance in the Ghanaian population seem advisable because the present study's exclusive focus on technical aspects does not allow us to answer this.

Author Contributions: Conceptualization, H.F., R.M.H., H.R. and U.L.; methodology, R.B., A.H., A.E.Z. and H.F.; software, R.B. and A.H.; validation, R.B. and A.H.; formal analysis, A.H.; investigation, R.B. and A.H.; resources, K.A.E., A.E.Z., T.F., F.S.S., V.D.C., H.F., U.L. and S.K.; data curation, R.B. and A.H.; writing—original draft preparation, R.B. and H.F.; writing—review and editing, R.B., A.H., K.A.E., R.M.H., H.R., S.K., A.E.Z., T.F., F.S.S., V.D.C., H.F. and U.L.; visualization, A.H. and H.F.; supervision, R.M.H., H.R. and H.F.; project administration, H.F.; funding acquisition, S.K. and A.E.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: We acknowledge support by the Open Access Publication Funds of the Magdeburg University and funding by the "Deutsche Forschungsgemeinschaft" (fund number ZA 697/6-1).

Institutional Review Board Statement: Ethical clearance allowing the use of anonymized residual volumes of sample materials for test comparison purposes without requirement of informed consent was obtained from the medical association of Hamburg, Germany (reference number: WF-011/19, provided on 11 March 2019), according to national German laws. The study was performed in line with the Declaration of Helsinki and its amendments.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All relevant data are presented in the article. Raw data can be provided on reasonable request.

Acknowledgments: Simone Priesnitz and Annett Michel are gratefully acknowledged for excellent technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

Appendix A

Table A1. Oligonucleotides applied for the compared target-specific real-time PCR assays.

Target Pathogen	Target Gene	Forward Primer	Reverse Primer	Probe(s) as Well as Modifications at the 5'- and 3'-Ends	Reference
<i>A(lia)rcobacter</i> spp. *	<i>gyrA</i>	5'-ATCTTTAGTATCTT TACAAGAAATGG-3'	5'-AACTGTTGTTT GTTTCCA-3'	5'-LC640-ATCAAGGAA GAAGTACAAGAGGTGT AAG-3' & 5'- AGTCTTGGTCAATGTA TTAGATTTGAACCTGAAA AAACAAG-Alexa488-3'	[36]
<i>A. butzleri</i>	<i>rpoB/C</i>	5'-GCCACACCAAGTGAC AATATC-3' & 5'-AAAA AATACCTTCTGGTCTT GTGGTGTA-3'	5'-AACAAACACCTTTG TATCTCATTTTTTG-3'	5'-HEX-TTGGACCAGTA AAAGATTATGAGTGCT TTGTGGTAAA-BHQ1-3'	[37]
<i>A. butzleri</i>	<i>hsp60</i>	5'-CTCTTCATTA AAAAGA GATGTTACCAATTTT-3'	5'-CACCATCTACATCT TCWGCAATAATTACT-3'	5'-FAM-CTTCCTGATT GATTTACTGATT-MBG- NFQ-3'	[38]

* Designed for the detection and melting curve-based discrimination of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cibarius*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter nitrofigilis*.

Table A2. Details of the run conditions of the compared real-time PCR assays.

	<i>gyrA</i> Assay	<i>rpoB/C</i> Assay	<i>hsp60</i> Assay	PhHV DNA-Based Inhibition Control Assay
Reaction chemistry				
Master Mix	HotStarTaq (Qiagen)	HotStarTaq (Qiagen)	HotStarTaq (Qiagen)	HotStarTaq (Qiagen)
Reaction volume (µL)	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
Forward primer concentration (nM)	700 nM	300 nM (each)	300 nM	300 nM
Reverse primer concentration (nM)	700 nM	300 nM	300 nM	300 nM
Probe concentration (nM)	200 nM (each)	100 nM	100 nM	100 nM
Final Mg ²⁺ concentration (nM)	2.0 mM	4.5 mM	4.5 mM	4.5 mM
Bovine serum albumin (ng/µL)	none	5 ng/µL	5 ng/µL	5 ng/µL
Run conditions				
Initial denaturation	95 °C, 15 min.	95 °C, 15 min.	95 °C, 15 min.	95 °C, 15 min.
Cycle numbers	50	40	40	40
Denaturation	95 °C, 10 s	95 °C, 15 s	95 °C, 15 s	95 °C, 15 s
Annealing	60 °C, 10 s	60 °C, 1 min.	60 °C, 1 min.	60 °C, 1 min.
Amplification	72 °C, 25 s	Identical with annealing step	Identical with annealing step	Identical with annealing step
Hold	95 °C, 1 min. followed by 45 °C, 50 s before melting, finally 40 °C, 30 s after melting	40 °C, 20 s	40 °C, 20 s	40 °C, 20 s
Melting conditions	Ramp from 45 °C to 80 °C with 5 cycles touchdown, rising of 1 °C each step, waiting for 90 s of pre-melt conditioning on first step, waiting for 4 s of each step afterwards, acquiring on green (Alexa 488) channel	Not applicable	Not applicable	Not applicable

Table A3. Sequence insert of the positive control plasmid.

Positive Control Insert Based on <i>A. butzleri</i> Sequences according to the NCBI Accession Numbers AB104481.1, AY628390.1 and DQ464331.1
5'-ACAAAAAATCTTTCATTAAGAGATGTTACCAATTTAGAAATCAGTAAATCAATCAGGAAGACCTTTAGTAATTAT TGCTGAAGATGTAGATGGTGAAGCATTAGCGAATTCGCAAGTCCAGAAAAATACITTTCTGGTCTTGGTGAAGTTAAAAA ACCTGAAACAATTAATTATAGAACATTAACAGAAAGAGATGGATTATTTGTGCTAAAATTTTGGACCAGTAAAGATTA TGAGTGTCTTTGGTAAATACAAAAAATGAGATACAAAGGTGTGTTTGGCAAAGAATTCACGAATCTAAATCTTTAGTATT CTTTACAAGAAATGGAATTATAAAAAAGAACATCATTAAATGAATTCAAAATATTAGAAGTAATGGTGAAGAGCTATTGTTT AGATGATGCAGATGAGATTGTAACAGCAAAAATTGCTGATGTAGAAAACAATACATTATGATATTACAAAGCTTTGGTCAATG TATTAGATTTGAACITGAAAAACAAGAGATCAAGGAAGAAGTACAAGAGGTGAAGAGGTATTAATTAATAAATTGATACA GACTTCGTTGTAGATGCTGATGTTATTAGTACTGAAGATCAAGAAATTAACAGTTTCAGAAAAAGGAATTCGAAAACGAAC AACAGTTGAAGAGTATA-3'

References

- Kiehlauch, J.A.; Brenner, D.J.; Nicholson, M.A.; Baker, C.N.; Patton, C.M.; Steigerwalt, A.G.; Wachsmuth, I.K. *Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness. *J. Clin. Microbiol.* **1991**, *29*, 376–385. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Vandamme, P.; Vancanneyt, M.; Pot, B.; Mels, L.; Hoste, B.; Dewettinck, D.; Vlaes, L.; van den Borre, C.; Higgins, R.; Hommez, J.; et al. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1992**, *42*, 344–356. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Pérez-Cataluña, A.; Salas-Massó, N.; Diéguez, A.L.; Balboa, S.; Lema, A.; Romalde, J.L.; Figueras, M.J. Revisiting the Taxonomy of the Genus *Arcobacter*: Getting Order From the Chaos. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2077. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Pérez-Cataluña, A.; Salas-Massó, N.; Diéguez, A.L.; Balboa, S.; Lema, A.; Romalde, J.L.; Figueras, M.J. Corrigendum (2): Revisiting the Taxonomy of the Genus *Arcobacter*: Getting Order from the Chaos. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2253. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Vandamme, P.; Goossens, H. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter*: A review. *Zentralbl. Bakteriol.* **1992**, *276*, 447–472. [\[CrossRef\]](#)
- Vandamme, P.; Falsen, E.; Rossau, R.; Hoste, B.; Segers, P.; Tytgat, R.; De Ley, J. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: Emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1991**, *41*, 88–103. [\[CrossRef\]](#)
- Snelling, W.J.; Matsuda, M.; Moore, J.E.; Dooley, J.S. Under the microscope: *Arcobacter*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2006**, *42*, 7–14. [\[CrossRef\]](#)
- Cervenka, L. Survival and inactivation of *Arcobacter* spp., a current status and future prospect. *Crit. Rev. Microbiol.* **2007**, *33*, 101–108. [\[CrossRef\]](#)
- Chieffi, D.; Fanelli, F.; Fusco, V. *Arcobacter butzleri*: Up-to-date taxonomy, ecology, and pathogenicity of an emerging pathogen. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19*, 2071–2109. [\[CrossRef\]](#)
- Shange, N.; Gouws, P.; Hoffman, L.C. *Campylobacter* and *Arcobacter* species in food-producing animals: Prevalence at primary production and during slaughter. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *35*, 146. [\[CrossRef\]](#)
- López-Vélez, R.; Lebens, M.; Bundy, L.; Barriga, J.; Steffen, R. Bacterial travellers' diarrhoea: A narrative review of literature published over the past 10 years. *Travel Med. Infect. Dis.* **2022**, *47*, 102293. [\[CrossRef\]](#)
- Ramees, T.P.; Dhama, K.; Karthik, K.; Rathore, R.S.; Kumar, A.; Saminathan, M.; Tiwari, R.; Malik, Y.S.; Singh, R.K. *Arcobacter*: An emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control—A comprehensive review. *Vet. Q.* **2017**, *37*, 136–161. [\[CrossRef\]](#)
- Lau, S.K.; Woo, P.C.; Teng, J.L.; Leung, K.W.; Yuen, K.Y. Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of *Arcobacter butzleri* bacteraemia in a patient with acute gangrenous appendicitis. *Mol. Pathol.* **2002**, *55*, 182–185. [\[CrossRef\]](#)
- Minaeva, N.Z.; Minaeva, V.I.; Sokolov, A.A.; Avilova, N.D.; Mitrokhin, S.D. Bacteria of the genus *Arcobacter*, a new etiological factor of nosocomial infections. *Antibiot. Khimioter.* **2006**, *51*, 18–22.
- Hänel, I.; Tomaso, H.; Neubauer, H. *Arcobacter*—An underestimated zoonotic pathogen? *Bundesgesundheitsblatt Gesundh. Gesundh.* **2016**, *59*, 789–794. [\[CrossRef\]](#)
- Ferreira, S.; Queiroz, J.A.; Oleastro, M.; Domingues, F.C. Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*: A review. *Crit. Rev. Microbiol.* **2016**, *42*, 364–383.
- Miltenburg, M.G.; Cloutier, M.; Craiovan, E.; Lapen, D.R.; Wilkes, G.; Topp, E.; Khan, I.U.H. Real-time quantitative PCR assay development and application for assessment of agricultural surface water and various fecal matter for prevalence of *Aliarcobacter faecis* and *Aliarcobacter lanthieri*. *BMC Microbiol.* **2020**, *20*, 164. [\[CrossRef\]](#)
- Figueras, M.J.; Levican, A.; Pujol, I.; Ballester, F.; Rabada Quilez, M.J.; Gomez-Bertomeu, F. A severe case of persistent diarrhoea associated with *Arcobacter cryaerophilus* but attributed to *Campylobacter* sp. and a review of the clinical incidence of *Arcobacter* spp. *New Microbes New Infect.* **2014**, *2*, 31–37. [\[CrossRef\]](#)

19. Whiteduck-Léveillé, K.; Whiteduck-Léveillé, J.; Cloutier, M.; Tambong, J.T.; Xu, R.; Topp, E.; Arts, M.T.; Chao, J.; Adam, Z.; André Lévesque, C.; et al. *Arcobacter lanthieri* sp. nov., isolated from pig and dairy cattle manure. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2015**, *65*, 2709–2716. [[CrossRef](#)]
20. Chuan, J.; Belov, A.; Cloutier, M.; Li, X.; Khan, I.U.H.; Chen, W. Comparative genomics analysis and virulence-related factors in novel *Aliarcobacter faecis* and *Aliarcobacter lanthieri* species identified as potential opportunistic pathogens. *BMC Genom.* **2022**, *23*, 471. [[CrossRef](#)]
21. Kerkhof, P.J.; Van den Abeele, A.M.; Strubbe, B.; Vogelaers, D.; Vandamme, P.; Houf, K. Diagnostic approach for detection and identification of emerging enteric pathogens revisited: The (*Aliarcobacter lanthieri*) case. *New Microbes New Infect.* **2020**, *39*, 100829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zambri, M.; Cloutier, M.; Adam, Z.; Lapen, D.R.; Wilkes, G.; Sunohara, M.; Topp, E.; Talbot, G.; Khan, I.U.H. Novel virulence, antibiotic resistance and toxin gene-specific PCR-based assays for rapid pathogenicity assessment of *Arcobacter faecis* and *Arcobacter lanthieri*. *BMC Microbiol.* **2019**, *19*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kim, N.H.; Park, S.M.; Kim, H.W.; Cho, T.J.; Kim, S.H.; Choi, C.; Rhee, M.S. Prevalence of pathogenic *Arcobacter* species in South Korea: Comparison of two protocols for isolating the bacteria from foods and examination of nine putative virulence genes. *Food Microbiol.* **2019**, *78*, 18–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Collado, L.; Figueras, M.J. Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2011**, *24*, 174–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Ho, H.T.; Lipman, L.J.; Gaastra, W. *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! *Vet. Microbiol.* **2006**, *115*, 1–13. [[CrossRef](#)]
26. Zautner, A.E.; Riedel, T.; Bunk, B.; Spröer, C.; Boahen, K.G.; Akenten, C.W.; Dreyer, A.; Färber, J.; Kaasch, A.J.; Overmann, J.; et al. Molecular characterization of *Arcobacter butzleri* isolates from poultry in rural Ghana. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2023**, *13*, 1094067. [[CrossRef](#)]
27. Ferreira, S.; Luís, Á.; Oleastro, M.; Pereira, L.; Domingues, F.C. A meta-analytic perspective on *Arcobacter* spp. antibiotic resistance. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2019**, *16*, 130–139. [[CrossRef](#)]
28. Bell, R.L.; Kase, J.A.; Harrison, L.M.; Balan, K.V.; Babu, U.; Chen, Y.; Macarasin, D.; Kwon, H.J.; Zheng, J.; Stevens, E.L.; et al. The Persistence of Bacterial Pathogens in Surface Water and Its Impact on Global Food Safety. *Pathogens* **2021**, *10*, 1391. [[CrossRef](#)]
29. Iwu, C.D.; Ekundayo, T.C.; Okoh, A.I. A Systematic Analysis of Research on *Arcobacter*: Public Health Implications from a Food-Environment Interphase Perspective. *Foods* **2021**, *10*, 1673. [[CrossRef](#)]
30. Meng, J.; Doyle, M.P. Emerging issues in microbiological food safety. *Annu. Rev. Nutr.* **1997**, *17*, 255–275. [[CrossRef](#)]
31. Hsu, T.T.; Lee, J. Global Distribution and Prevalence of *Arcobacter* in Food and Water. *Zoonoses Public Health* **2015**, *62*, 579–589. [[CrossRef](#)]
32. Calvo, G.; Arias, M.L.; Fernández, H. *Arcobacter*: A foodborne emerging pathogen. *Arch. Latinoam. Nutr.* **2013**, *63*, 164–172.
33. Adesiji, Y.O.; Oloke, J.K.; Emikpe, B.O.; Coker, A.O. *Arcobacter*, an emerging opportunistic food borne pathogen—A review. *Afr. J. Med. Med. Sci.* **2014**, *43*, 5–11.
34. Lehner, A.; Tasara, T.; Stephan, R. Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *102*, 127–135. [[CrossRef](#)]
35. Levican, A.; Figueras, M.J. Performance of five molecular methods for monitoring *Arcobacter* spp. *BMC Microbiol.* **2013**, *13*, 220. [[CrossRef](#)]
36. Abdelbaqi, K.; Buissonnière, A.; Prouzet-Mauleon, V.; Gresser, J.; Wesley, I.; Mégraud, F.; Ménard, A. Development of a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR to detect *Arcobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 3015–3021. [[CrossRef](#)]
37. Brightwell, G.; Mowat, E.; Clemens, R.; Boerema, J.; Pulford, D.J.; On, S.L. Development of a multiplex and real time PCR assay for the specific detection of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*. *J. Microbiol. Methods* **2007**, *68*, 318–325. [[CrossRef](#)]
38. de Boer, R.F.; Ott, A.; Güren, P.; van Zanten, E.; van Belkum, A.; Kooistra-Smid, A.M. Detection of *Campylobacter* species and *Arcobacter butzleri* in stool samples by use of real-time multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 253–259. [[CrossRef](#)]
39. Liu, L.; Cloutier, M.; Craiovan, E.; Edwards, M.; Frey, S.K.; Gottschall, N.; Lapen, D.R.; Sunohara, M.; Topp, E.; Khan, I.U.H. Quantitative real-time PCR-based assessment of tile drainage management influences on bacterial pathogens in tile drainage and groundwater. *Sci. Total Environ.* **2018**, *624*, 1586–1597. [[CrossRef](#)]
40. González, A.; Suski, J.; Ferrús, M.A. Rapid and accurate detection of *Arcobacter* contamination in commercial chicken products and wastewater samples by real-time polymerase chain reaction. *Foodborne Pathog. Dis.* **2010**, *7*, 327–338. [[CrossRef](#)]
41. Shrestha, R.G.; Tanaka, Y.; Malla, B.; Tandukar, S.; Bhandari, D.; Inoue, D.; Sei, K.; Sherchand, J.B.; Haramoto, E. Development of a Quantitative PCR Assay for *Arcobacter* spp. and its Application to Environmental Water Samples. *Microbes Environ.* **2018**, *33*, 309–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Hausdorf, L.; Neumann, M.; Bergmann, I.; Sobiella, K.; Mundt, K.; Fröhling, A.; Schlüter, O.; Klocke, M. Occurrence and genetic diversity of *Arcobacter* spp. in a spinach-processing plant and evaluation of two *Arcobacter*-specific quantitative PCR assays. *Syst. Appl. Microbiol.* **2013**, *36*, 235–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Caruso, M.; Latorre, L.; Santagada, G.; Fracalvieri, R.; Difato, L.M.; Miccolupo, A.; Capozzi, L.; Bonerba, E.; Mottola, A.; Parisi, A. *Arcobacter* spp. in bovine milk: An emerging pathogen with potential zoonotic risk. *Ital. J. Food Saf.* **2019**, *7*, 7685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Marta, C.; Giovanni, N.; Angela, M.; Loredana, C.; Elisabetta, B.; Laura, D.; Anna, M.; Angela, D.P.; Gianfranco, S.; Antonio, P. Large genetic diversity of *Arcobacter butzleri* isolated from raw milk in Southern Italy. *Food Microbiol.* **2020**, *89*, 103403. [\[CrossRef\]](#)
45. González, A.; Ferrús, M.A. Study of *Arcobacter* spp. contamination in fresh lettuces detected by different cultural and molecular methods. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *145*, 311–314. [\[CrossRef\]](#)
46. Ferreira, S.; Júlio, C.; Queiroz, J.A.; Domingues, F.C.; Oleastro, M. Molecular diagnosis of *Arcobacter* and *Campylobacter* in diarrhoeal samples among Portuguese patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *78*, 220–225. [\[CrossRef\]](#)
47. Lee, C.; Agidi, S.; Marion, J.W.; Lee, J. *Arcobacter* in Lake Erie beach waters: An emerging gastrointestinal pathogen linked with human-associated fecal contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 5511–5519. [\[CrossRef\]](#)
48. Hahn, A.; Podbielski, A.; Meyer, T.; Zautner, A.E.; Loderstädt, U.; Schwarz, N.G.; Krüger, A.; Cadar, D.; Frickmann, H. On detection thresholds—A review on diagnostic approaches in the infectious disease laboratory and the interpretation of their results. *Acta Trop.* **2020**, *205*, 105377. [\[CrossRef\]](#)
49. Qu, Y.; Tan, M.; Kutner, M.H. Random effects models in latent class analysis for evaluating accuracy of diagnostic tests. *Biometrics* **1996**, *52*, 797–810. [\[CrossRef\]](#)
50. Eberhardt, K.A.; Sarfo, F.S.; Dompok, A.; Kuffour, E.O.; Geldmacher, C.; Soltau, M.; Schachscheider, M.; Drexler, J.F.; Eis-Hübinger, A.M.; Häussinger, D.; et al. *Helicobacter pylori* Coinfection Is Associated With Decreased Markers of Immune Activation in ART-Naive HIV-Positive and in HIV-Negative Individuals in Ghana. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *61*, 1615–1623. [\[CrossRef\]](#)
51. Sarfo, F.S.; Eberhardt, K.A.; Dompok, A.; Kuffour, E.O.; Soltau, M.; Schachscheider, M.; Drexler, J.F.; Eis-Hübinger, A.M.; Häussinger, D.; Oteng-Seifah, E.E.; et al. *Helicobacter pylori* Infection Is Associated with Higher CD4 T Cell Counts and Lower HIV-1 Viral Loads in ART-Naive HIV-Positive Patients in Ghana. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0143388. [\[CrossRef\]](#)
52. Bossuyt, P.M.; Reitsma, J.B.; Bruns, D.E.; Gatsonis, C.A.; Glasziou, P.P.; Irwig, L.; Lijmer, J.G.; Moher, D.; Rennie, D.; de Vet, H.C.; et al. STARD 2015: An updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ* **2015**, *351*, h5527. [\[CrossRef\]](#)
53. Niesters, H.G. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods* **2001**, *25*, 419–429. [\[CrossRef\]](#)
54. Goodman, L.A. Latent class analysis: The empirical study of latent types, latent variables, and latent structures. In *Applied Latent Class Analysis*; Hagenaars, J.A., McCutcheon, A.L., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2002; pp. 3–55.
55. Landis, J.R.; Koch, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **1977**, *33*, 159–174. [\[CrossRef\]](#)
56. Dekker, D.; Eibach, D.; Boahen, K.G.; Akenten, C.W.; Pfeifer, Y.; Zautner, A.E.; Mertens, E.; Krumkamp, R.; Jaeger, A.; Flieger, A.; et al. Fluoroquinolone-Resistant *Salmonella enterica*, *Campylobacter* spp., and *Arcobacter butzleri* from Local and Imported Poultry Meat in Kumasi, Ghana. *Foodborne Pathog. Dis.* **2019**, *16*, 352–358. [\[CrossRef\]](#)
57. Krumkamp, R.; Sarpong, N.; Schwarz, N.G.; Adlkofer, J.; Loag, W.; Eibach, D.; Hagen, R.M.; Adu-Sarkodie, Y.; Tannich, E.; May, J. Gastrointestinal infections and diarrheal disease in Ghanaian infants and children: An outpatient case-control study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0003568.
58. Eibach, D.; Krumkamp, R.; Hahn, A.; Sarpong, N.; Adu-Sarkodie, Y.; Leva, A.; Käsmaier, J.; Panning, M.; May, J.; Tannich, E. Application of a multiplex PCR assay for the detection of gastrointestinal pathogens in a rural African setting. *BMC Infect. Dis.* **2016**, *16*, 150. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

2. Zusammenfassende Darstellung der Publikation

2.1 Einleitung

Arcobacter (A.) butzleri (synonym: *Aliarcobacter butzleri*, zuvor *Campylobacter butzleri*) ist ein fakultativ pathogenes Bakterium aus der Ordnung Campylobacterales, Familie Arcobacteraceae (Kiehlbauch et al. 1991, Vandamme et al. 1992, Pérez-Cataluña et al. 2018, Pérez-Cataluña et al. 2019, Vandamme et Goossens 1992, Vandamme et al. 1991, Snelling et al. 2006, Cervenka 2007). Das pathogene Potential von *Arcobacter* spp. ist mit der Fähigkeit zur Adhäsion, Zellinvasion, Induktion von Immunantwort und Toxinproduktion verbunden, seine genetischen Determinanten sind homolog zum Genom der phylogenetisch nah verwandten *Campylobacter* spp. (Ferreira et al. 2016, Figueras et al. 2014, Chuan et al. 2022, Kerkhof et al. 2020, Zambri et al. 2019, Kim et al. 2019, Collado et Figueras 2011, Ho et al. 2006).

A. butzleri wird seit 2002 zunehmend als relevanter Krankheitserreger bewertet, welcher beim Menschen unter anderem Diarrhoe, Enteritis, gangränöse Appendizitis und Endokarditis auslösen kann (Chieffi et al. 2020, Shange et al. 2019, López-Vélez et al. 2022, Ramees et al. 2017, Lau et al. 2002, Minaeva et al. 2006, Ferreira et al. 2016, Collado et Figueras 2011, Zautner et al. 2023, Ferreira et al. 2019, Calvo et al. 2013).

Als Reservoir wurden Nutztierbestände von Geflügel und Schweinen identifiziert. *A. butzleri* wird aufgrund von Humaninfektionen, die von diesem Reservoir ausgehen, als zoonotische Erkrankung betrachtet (Hänel et al. 2016, Collado et Figueras 2011, Calvo et al. 2013). Die Transmission insbesondere über rohe Fleischwaren und kontaminiertes Trinkwasser konnte nachgewiesen werden (Bell et al. 2021, Iwu et al. 2021, Meng et Doyle 1997, Hsu et Lee 2015). *Arcobacter* spp. kann die Bedingungen bei der Verarbeitung und Lagerung von Fleischwaren überstehen, wodurch die Verbreitung in der menschlichen Population begünstigt wird (Ramees et al. 2017, Hänel et al. 2016, Ferreira et al. 2016, Miltenburg et al. 2020, Figueras et al. 2014, Collado et Figueras 2011).

Auf die bisher nicht standardisierte, kulturelle Isolation und Differenzierung von *A. butzleri* aus Stuhlproben in humanmedizinischen Laboratorien (Hänel et al. 2016, Calvo et al. 2013) ist, nicht allein aber unter anderem, die unzureichende Dokumentation zu *A. butzleri*-assoziierten Erkrankungen aus Hochprävalenzgebieten, wie beispielsweise Nigeria, zurückzuführen (Adesiji et al. 2014). Die kulturelle Anzucht von *Arcobacter* spp. ist zwar auf Standard-Agars wie Blut-, Kochblut- und MacConkey-Agar unter mit 5 % CO₂-angereicherten Atmosphärenbedingungen sowohl mikroaerophil als auch aerob innerhalb eines Temperaturspektrums von 37 °C bis zu 15 °C grundsätzlich möglich, jedoch empfehlen gängige Anzuchtprotokolle neben einer Inkubationszeit von insgesamt vier bis fünf Tagen eine Anreicherung mittels Selektiv-Boullion und Selektiv-Agar zur Suppression bakterieller Begleitflora (Lau et al. 2002, Kim et al. 2019, Lehner et al. 2005). Die biochemische Differenzierung ist herausfordernd (Ramees et al. 2017, Lau et al. 2002), ferner

hängt die Zuverlässigkeit der Differenzierung mittels Massenspektrometrie (matrix-assisted laser-desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI) von der Qualität der jeweils verwendeten Datenbank ab (Figueras et al. 2014). In einer portugiesischen Studie mit knapp 300 Diarrhoe-Stuhlproben konnte in lediglich 0,11 - 1,25 % der Fälle Isolate von *Arcobacter* spp. nachgewiesen werden, was von den Autor:innen auch auf Sensitivitätsdefizite der diagnostischen Strategie, einhergehend mit einer unterschätzten, wahren Prävalenz zurückgeführt wurde (Figueras et al. 2014).

Im Hinblick auf die beschriebenen Limitationen der kulturbasierten *Arcobacter* spp.-Diagnostik (Ramees et al. 2017, Lau et al. 2002, Hänel et al. 2016, Figueras et al. 2014, Kim et al. 2019, Calvo et al. 2013, Adesiji et al. 2014, Lehner et al. 2005) wurde die molekulare Diagnostik mittels PCR sowie real-time PCR als potentiell sensitivere Option evaluiert (Lau et al. 2002, Levican et Figueras 2013, Levican et Figueras 2013). Für *Arcobacter* spp., wie auch *A. butzleri*, wurden Fluorescence-resonance Energytransfer (FRET)- und Hybridisierungssonden-basierte real-time PCR-Assays etabliert und für unterschiedliche diagnostische Fragestellungen eingesetzt (Miltenburg et al. 2020, Abdelbaqi et al. 2007, Brightwell et al. 2007, de Boer et al. 2013, Liu et al. 2018, González et al. 2010, Shrestha et al. 2018, Hausdorf et al. 2013, Caruso et al. 2019, Marta et al. 2020, González et Ferrús 2011, Ferreira et al. 2014, Lee et al. 2012). Die bisher dazu veröffentlichten Evaluationsstudien basieren jedoch überwiegend auf einer geringen Anzahl untersuchten Proben.

Das Ziel der Studie war es, verfügbare *A. butzleri* real-time PCR-Assays, in einem Testvergleich ohne Nutzung einer Referenzmethode mittels Latent Class Analyse (LCA) hinsichtlich ihrer diagnostischen Akkuratessse zu evaluieren (Hahn et al. 2020, Abdelbaqi et al. 2007, Brightwell et al. 2007, de Boer et al. 2013, Qu et al. 1996). Dazu wurden Proben mit einer hohen Prätest-Wahrscheinlichkeit bei bekannt häufigem, regionalem Vorkommen des Erregers verwendet (Zautner et al. 2023).

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Proben für Testvergleich, Ein- und Ausschlusskriterien

Der Testvergleich der drei bewerteten real-time PCR-Assays zum Nachweis von *A. butzleri* in menschlichen Stuhlproben wurde in zwei Schritten durchgeführt. Die Zielgene der PCRs sind *rpoB/C*, *hsp60* und *gyrA*. Die verwendeten Sonden und Primer mit den spezifischen Sequenzen, sowie die eingesetzten Reagenzien und Laufprotokolle sind in Tabelle A1 und A2 im Paper aufgeführt

Zunächst wurden die drei Assays auf ihre grundsätzliche Eignung zur Detektion von *A. butzleri* in hoher Erregerdichte getestet. Dafür wurden 65 humane Stuhlproben mit hohen Endkonzentrationen von etwa 10^7 koloniebildenden Einheiten (KBE) pro Liter mit folgenden Mikroorganismen gespikkt: verschiedene *A. butzleri*-Stämme ($n = 30$), *A. cryaerophilus*-Stämme ($n = 22$), Nutztier-assoziierte *A. lanthieri*-Stämme ($n = 12$) (Whiteduck-Léveillé et al. 2015) sowie mit einem einzelnen *Campylobacter coli*-Stamm. Verdünnungsreihen zur Identifizierung der technischen Nachweisgrenzen wurden mit standardisierten Plasmid-basierten Positivkontrollen titriert (siehe 2.3).

Anschließend wurden mit den drei Assays ghanaische Stuhlproben untersucht, welche bei bekannt hoher Prävalenz des Erregers in Westafrika eine hohe Vortestwahrscheinlichkeit hatten, *A. butzleri*-spezifische DNA zu enthalten (Zautner et al. 2023, Adesiji et al. 2014). Eine andere Methode zum Nachweis der gesuchten Mikroorganismen wurde, konsistent mit dem Konzept des Testvergleiches ohne Goldstandard, nicht angewendet. Grund ist, dass ein „Goldstandard“ (=Referenztest mit jeweils 100%-iger Sensitivität und Spezifität (Hahn et al. 2020)) für diesen Erreger nicht verfügbar ist. Die Residualproben-Sammlung umfasste insgesamt 1570 Stuhlproben die im Rahmen vorausgegangener Studien zu ghanaischen HIV-Patienten (Eberhardt et al. 2015, Sarfo et al. 2015) und einer unveröffentlichten Untersuchung zur Einschätzung der Epidemiologie gastrointestinaler Pathogene bei ghanaischen Kindern unter zwei Jahren, vor etwa zehn Jahren gewonnen wurden.

Proben, welche eine PCR-Inhibition aufwiesen, wurden aus der Kalkulation der diagnostischen Akkuratessse ausgeschlossen (siehe 2.3). In Übereinstimmung mit den ethischen Voraussetzungen für die Untersuchung, wurden die Daten der Stuhlsponder vollständig anonymisiert. Dementsprechend stehen keine Daten zu Alter, Geschlecht oder klinischen Symptomen zur Verfügung. Dies stellt eine Abweichung von den Kriterien des Standards of Reporting Diagnostic Accuracy (STARD) dar (Bossuyt et al. 2015), wie hier kritisch einzuräumen ist.

2.2.2 Extraktion und Lagerung der Nukleinsäuren

Die Nukleinsäuren wurden mithilfe des QIAmp-Stuhl-DNA-Minikits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstelleranleitung extrahiert und bis zur Molekulardiagnostik bei -80°C gelagert.

2.2.3 Vergleichende real-time PCR-Assay-Untersuchung zum Nachweis von *A. butzleri*

Der Testvergleich bezog zwei real-time PCR-Assays mit Hybridisierungssonden für die *A. butzleri* -Zielgene *rpoB/C* (Brightwell et al. 2007) und *hsp60* (de Boer et al. 2013) sowie eine FRET-basierte real-time PCR, welche für das Zielgen *gyrA* von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. cibarius* und *A. nitrofigilis* entwickelt wurde, ein. Die *gyrA*-basierte Diskriminierung der *Arcobacter*-Stämme

erfolgte anhand der gemessenen Fluoreszenzpeaks in der Schmelzkurvenanalyse (Abdelbaqi et al. 2007). Die publizierten Laufprotokolle wurden an den Corbett Q Cycler (Qiagen, Hilden, Deutschland) adaptiert und geringfügig angepasst (Abdelbaqi et al. 2007, Brightwell et al. 2007, de Boer et al. 2013). Details zu den genutzten Oligonukleotiden, Reagenzien und Laufprotokollen sind im veröffentlichten Paper im Anhang A aufgeführt. In den Läufen wurden jeweils eine Wasser-basierte Negativ- und eine Plasmid-basierte Positivkontrolle mitgeführt. Das verwendete Sequenzinsert im Vektor pEX A128 (eurofins Genomics, Luxemburg) ist ebenfalls im veröffentlichten Paper im Anhang A angegeben. Die Verdünnungsreihen mit dem Kontrollplasmid ergaben unter Nutzung der internetbasierten Software "Calculator for determining the number of copies of a template" (URI Genomics and Sequencing Center, <https://cels.uri.edu/gsc/cndna.html> Stand: 08.03.2023) berechnete technische Nachweisgrenzen von 37,1 Kopien/ μ L für die *hsp60*- und *gyrA*-PCRs sowie von 370,5 Kopien/ μ L für die *rpoB/C*-PCR. Mittels einer real-time PCR die eine Zielsequenz des Phocid-Herpes-Virus (PhHV) amplifiziert, wurde eine relevante PCR-Inhibition ausgeschlossen oder bestätigt (Niesters 2001).

2.2.4 Bestimmung der diagnostischen Genauigkeit, Übereinstimmung und Vergleich der erhaltenen Zyklusgrenzwerte (Ct)

Die im ersten Schritt der Auswertung, also der Analyse der hochtitrig gespikten Stuhlproben, festgestellten Reaktionsausfälle einschließlich der gemessenen Ct-Werte und Schmelzkurven wurden deskriptiv erfasst und bewertet. Dieser Schritt wurde genutzt, um die spezifischen Schmelztemperaturen für *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* unter den adaptierten Laufbedingungen in der *gyrA*-PCR zu definieren. Das als Positivkontrolle verwendete Plasmid enthielt dafür lediglich eine *A. butzleri*-spezifische *gyrA*-Sequenz, so dass eine Aussage für *A. cryaerophilus* damit allein nicht möglich war.

Im zweiten Schritt wurde die LCA (Hahn et al. 2020, Qu et al. 1996, Goodman 2002) angewendet, um die diagnostischen Leistungscharakteristika der verglichenen real-time PCR-Assays für die Detektion von *A. butzleri* in Stuhlproben unter diagnostischen real-life-Bedingungen zu bestimmen. Die LCA ist ein Strukturgleichungsmodell, mit dem unbekannte Variablen, wie hier der reale Infektions- oder Kolonisationsstatus der Stuhlsponder mit *A. butzleri*, über direkt beobachtbare Variablen, wie hier die Testergebnisse der *A. butzleri*-spezifischen PCRs bestimmt werden (Hahn et al. 2020, Qu et al. 1996, Goodman 2002). Positive real-time PCR-Ergebnisse der *gyrA*-PCR außerhalb der ermittelten *A. butzleri*-spezifischen Schmelztemperaturen wurden als *A. butzleri*-negativ gewertet. Da sich die *gyrA*-Gensequenz unter Selektionsdruck in Grenzen verändern kann, wurde eine um ± 1 °C von der Zieltemperatur abweichende Schmelztemperatur als spezifisch gewertet. Des Weiteren wurde die LCA benutzt, um auf Basis der diagnostischen Genauigkeit, eine adjustierte Prävalenzschätzung bezüglich *A. butzleri* in der untersuchten Population vorzunehmen. Entsprechend der Empfehlungen von Landis und Koch wurde Fleiss' Kappa für die Konkordanz der Resultate der untersuchten real-time PCR-Assays berechnet und interpretiert (Landis et Koch 1977). Außerdem wurden die gemessenen Ct-Werte beschreibend verglichen. Grundsätzlich

wurden nur real-time PCR-Signale mit typisch sigmoidalem Amplifikationskurvenverlauf, allerdings ohne definierte Ct-Grenzwerte als positiv gewertet. Alle statistischen Auswertungen wurden mit der Software Stata/IC 15.1 für Mac 64-bit Intel (College Station, TX, USA) erstellt.

2.2.5 Ethik

Die ethische Freigabe zur Nutzung der vollständig anonymisierten Residualproben für die Testvergleiche wurden von der Ärztekammer Hamburg erteilt (Referenznummer: WF-011/19, 11.03.2019). Unter diesen Voraussetzungen war eine weitere informierte Einwilligung nicht erforderlich.

2.3 Ergebnisse

In der vorangestellten Publikation sind die Ergebnisse ausführlich dargestellt und werden im Folgenden zusammengefasst.

2.3.1 Qualitative und quantitative Ergebnisse der gespikten Probenmaterialien

Die drei untersuchten *A. butzleri*-spezifischen real-time PCR-Assays identifizierten die 30 mit *A. butzleri* hochtitrig gespikten Stuhlproben korrekt. Kreuzreaktive Ergebnisse ergaben sich bei den Proben mit *A. cryaerophilus* für die *hsp60*-PCR in 6 von 22 Fällen und in 16 von 22 Fällen für die *rpoB/C*-PCR. Für die *hsp60*-PCR lag die mittlere Ct-Wert-Differenz zwischen den mit *A. butzleri* dotierten Proben und jenen mit *A. cryaerophilus* bei 14,9 und für die *rpoB/C*-PCR bei 4,5 Ct-Stufen. Der *gyrA*-Assay zeigte bei 21 der 22 *A. cryaerophilus*-gespikten Proben die erwartete Reaktion mit klar unterscheidbarer Schmelztemperatur im Vergleich zu den *A. butzleri*-gespikten Proben. Ferner zeigte sich als Korrelat einer imperfekten Primerbindung bei *A. cryaerophilus* eine moderate Ct-Wert-Differenz von 7,3 im Vergleich mit *A. butzleri* in der *gyrA*-PCR. Alle 12 *A. lanthieri*-gespikten Stuhlproben waren in den drei untersuchten real-time PCR-Assays negativ. Details sind im Paper in Tabelle 1 und deren Fußnoten aufgeführt. Die Probe, welche mit *C. coli* gespikt war, zeigte nur in der *rpoB/C*-PCR ein kreuzreagierendes Signal mit einem deutlich höheren Ct-Wert als im Vergleich mit dem mittleren Ct-Wert der *A. butzleri*-gespikten Proben.

2.3.2 Berechnung der Sensitivität und Spezifität der Tests auf Grundlage der LCA, Vergleich der untersuchten Assays und adjustierte Prävalenzschätzung

Für die LCA-basierte Beurteilung der Leistungscharakteristike der verglichenen PCR-Assays für den Nachweis von *A. butzleri*-DNA in Stuhlproben wurden 75 Proben, welche eine PCR-Inhibition aufwiesen, ausgeschlossen. Somit ergab sich eine Gesamtzahl von $n = 1495$ in die Evaluation

eingeschlossenen, ghanaischen Stuhlproben. Wie im Paper in Tabelle 2 detailliert aufgeführt, reichte die Anzahl positiver PCR-Ergebnisse unter diesen Proben von $n = 30$ bei der *gyrA*-PCR bis zu $n = 245$ bei der *hsp60*-PCR. Bezogen auf die diagnostischen Leistungscharakteristika zeigte sich eine berechnete Sensitivität mit einem breiten Spektrum von 100 % bis 12,7 % in absteigender Reihenfolge von der *rpoB/C*-PCR über die *hsp60*-PCR bis zur *gyrA*-PCR. Für die *rpoB/C*-PCR konnte die berechnete Sensitivität nur mit einem sehr breiten 95 %-Konfidenzintervall ermittelt werden. Die berechneten Spezifitäten lagen mit 98,8 % bis 96,8 % in absteigender Reihenfolge von der *gyrA*-PCR über die *rpoB/C*-PCR bis zur *hsp60*-PCR, wesentlich näher zusammen. Die aus den Ergebnissen der drei verglichenen PCR-Assays errechnete Kappa-Konkordanz war, hauptsächlich bedingt durch den Einfluss der *gyrA*-PCR-Ergebnisse, nur moderat. Wird lediglich die *hsp60*-PCR mit der *rpoB/C*-PCR verglichen, steigt die Kappa-Konkordanz auf einen adäquateren Wert von 0,812 (0,771 - 0,852). Konkordanz und Diskordanz zwischen den einzelnen verglichenen real-time PCR-Assays sind im Paper in Tabelle 3 dargestellt. Basierend auf der LCA-Berechnung, wurde die Prävalenz von *A. butzleri* in den Stuhlproben der untersuchten ghanaischen Population auf 14,8 % eingeschätzt.

2.3.3 Vergleich der gemessenen Ct-Werte

Die erfassten Ct-Werte der drei verglichenen real-time PCR-Assays bewegten sich für die 1495 in die LCA eingeschlossenen Proben im Bereich von 32 bis 40,5. Hierbei zeigt sich ein ansteigender medianer Ct-Wert von der *hsp60*-PCR über die *rpoB/C*-PCR bis zur *gyrA*-PCR (siehe Tabelle 4 im Paper). Während sich die gemessenen Ct-Werte der *hsp60*-PCR und der *rpoB/C*-PCR glichen, lagen die Werte der *gyrA*-PCR im Durchschnitt sechs bis neun Ct-Stufen höher.

2.4 Diskussion

2.4.1 Bewertung

Im Rahmen der Studie wurde ein LCA-basierter Vergleich dreier real-time PCR-Assays für *A. butzleri* mit unterschiedlichen Zielgenen als Testvergleich ohne Goldstandard aufgelegt. Die oben beschriebenen Ergebnisse der Untersuchung werden im Folgenden mit zuvor beschriebenen Resultaten in Kontext gesetzt.

In den initialen Untersuchungen mit hochtitrig gespikten Proben zeigte sich, dass keiner der drei real-time PCR-Assays vollständig spezifisch für *A. butzleri* war. Es traten insbesondere Kreuzreaktionen mit der phylogenetisch eng verwandten *A. cryaerophilus*-Spezies auf. Das beobachtete PCR-Signal der mit *Campylobacter coli* gespikten Probe wurde aufgrund der außerordentlich weiten Ct-Wert-rechts-Verschiebung trotz hoher Erreger-DNA-Dichte für die diagnostische Situation als kaum relevant erachtet. Die Reaktion mit *A. cryaerophilus* im *gyrA*-PCR-Assay (Abdelbaqi et al. 2007) ließ sich anhand der Schmelzkurvenanalyse von

A. butzleri-gespikten Proben gut unterscheiden. Diese Schmelzkurven-basierte Unterscheidung ist designbedingt bei den Hybridisierungssonden-basierten *rpoB/C*- und *hsp60*-PCR-Assays nicht möglich. Durch Basenfehlpaarung im Bereich der Primersequenzen kam es jedoch zu einer Verschiebung der detektierten Ct-Werte in der *hsp60*-PCR um 14,9 und in der *rpoB/C*-PCR um 4,5 Stufen bei den mit *A. cryaerophilus* gespikten Proben im Vergleich mit den *A. butzleri*-gespikten Proben. Bei in-vitro erwartbaren Konzentrationen der Erreger-DNA in humanen Stuhlproben könnte eine geringere Empfindlichkeit der Hybridisierungssonden-basierten PCR-Assays gegenüber kreuzreagierenden Nicht-Ziel-Erregern dazu beitragen, die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse zu reduzieren. Die Beobachtungen bestätigen insgesamt jedoch die bereits beschriebenen Herausforderungen hinsichtlich des Designs zuverlässig selektiver *A. butzleri*-PCR-Assays (Levican et Figueras 2013).

Die LCA-Untersuchung zeigt hinsichtlich der diagnostischen Leistungscharakteristika der drei verglichenen real-time PCR-Assays, beträchtliche Unterschiede hinsichtlich des Nachweises von *A. butzleri* (Levican et Figueras 2013, Abdelbaqi et al. 2007, Brightwell et al. 2007, de Boer et al. 2013). Der FRET-Assay mit dem Zielgen *gyrA* (Abdelbaqi et al. 2007) wies die beste Spezifität von nahezu 100 % auf, allerdings zum Preis einer sehr niedrigen Sensitivität von unter 15 %. In Anbetracht der hohen Ct-Werte der *gyrA*-PCR-positiven ghanaischen Proben, ist davon auszugehen, dass die verwendeten DNA-Mengen sehr nah an der technischen Nachweisgrenze dieser PCR lagen, was die niedrige Sensitivität verursacht haben könnte. Der Hybridisierungssonden-basierte *hsp60*-Assay hatte eine mittlere Sensitivität von fast 95 % aber im Vergleich die geringste Spezifität mit weniger als 97 %. Letzteres ist gleichermaßen der Grund für die berechnete Sensitivität des *hsp60*-Assays unterhalb der berechneten Sensitivität des *rpoB/C*-Assays, auch wenn zugleich mehr positive Ergebnisse mit dem *hsp60*-Assay in der Probensammlung registriert werden konnten. Fokussiert auf die beobachtete, höhere Wahrscheinlichkeit der Kreuzreaktivität der *rpoB/C*-PCR mit *A. cryaerophilus*-gespikten Proben im Vergleich zur *hsp60*-PCR, erscheint die niedrigere Spezifität der letzteren vielleicht überraschend. Jedoch ergaben die Schmelzkurvenanalysen der Nicht-*A. butzleri*-assoziierten positiven Ergebnisse des *gyrA*-Assays nur einer sehr geringen Prävalenz lediglich nur sechs *A. cryaerophilus*-positiven Proben, von welchen vier zudem negative Ergebnisse in der *hsp60*-PCR aufwiesen. Unter Berücksichtigung dieser quantitativ niedrigen Relevanz von *A. cryaerophilus* als potentiell interferierendem Agens in der ghanaischen Probensammlung, ist ein relevanter Effekt dieser Spezies auf die ermittelten diagnostischen Leistungsdaten mit hoher Wahrscheinlichkeit zu vernachlässigen. Der *rpoB/C*-Assay ist der einzige Test mit einer berechneten Sensitivität von mehr als 95 %, wenn man die aus dem breiten 95 %-Konfidenzintervall resultierende Unsicherheit bei einer Spezifität von etwas mehr als 98 %, akzeptiert. Trotz des berechneten breiten Konfidenzintervalls der Sensitivität der *rpoB/C*-PCR, wird die wahre Sensitivität des Assays wahrscheinlich tatsächlich hoch sein. Dafür die beobachtete Kombination aus einer hohen Anzahl positiver PCR-Signale, der hohen Übereinstimmung der Ergebnisse mit der *hsp60*-PCR, welche eine Sensitivität von fast 95 % hat und einer durchaus akzeptablen Spezifität. Die relativ gute Spezifität des *rpoB/C*-Assays mag überraschend erscheinen, bedenkt man die hohe Rate an

beobachteten Übereinstimmungen positiver *rpoB/C*-PCR-Ergebnisse mit positiven *gyrA*-PCR-Ergebnissen, bei denen die Schmelzkurvenanalyse Hinweise auf die Amplifikation von Nicht-*A. butzleri*-DNA ergab. Jedoch können die beobachteten Nicht-*A. butzleri*-spezifischen *gyrA*-PCR Schmelzkurven auch auf Ko-Kolonisation der Stuhlsponder mit *A. butzleri* und einem kreuzreagierenden Nicht-Zielmikroorganismus zurückzuführen sein, wobei eine höhertitrigere DNA-Konzentration der Nicht-Zielorganismen das *gyrA*-Assay-Signal maßgeblich beeinflusst hätte. Somit kann nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass positive *rpoB/C*-PCR-Ergebnisse in Fällen eines positiven *gyrA*-PCR-Ergebnisses, bei dem die Auswertung der Schmelzkurvenanalyse Nicht-*A. butzleri*-DNA ergab, falsch positiv sein müssen. Gleiches gilt für positive *hsp60*-PCR-Ergebnisse in Konkordanz mit Nicht-*A. butzleri*-spezifischen positiven *gyrA*-PCR-Signalen. Die Annahme einer möglichen Ko-Kolonisation wird durch nahezu gleichen Ergebnisse positiver mittleren Ct-Werte der *hsp60*- und *rpoB/C*-PCR-Signale unabhängig von der beobachteten Schmelztemperatur in der *gyrA*-PCR, gestützt. Ein breite Spektrum der registrierten Schmelztemperaturen der Nicht-*A. butzleri*-spezifischen positiven *gyrA*-PCR-Signale weist auf eine ganze Reihe phylogenetisch verwandter Nicht-Zielorganismen und auf assoziierte potentielle Kreuzreaktivitäten in der Residualprobensammlung hin.

Schließlich bestätigte die LCA-basierte Prävalenzschätzung von 14,8 % *A. butzleri*-positiven Fällen bei den untersuchten ghanaischen Stuhlproben die Ausgangshypothese, dass die gewählte Probensammlung mit einer hohen Prätest-Wahrscheinlichkeit assoziiert war. Dieses Ergebnis passt zu Studien, welche eine sogar höhere Prävalenz von *A. butzleri* im Vergleich mit *Campylobacter* spp. in ghanaischen Nutztierbeständen postulierten (Dekker et al. 2019), sowie zu Berichten über hohe Raten an Kolonisation und gastrointestinalen Infektionen mit bakteriellen Pathogenen innerhalb der ghanaischen Bevölkerung insgesamt (Krumkamp et al. 2015, Eibach et al. 2016) und zu einer hohen *A. butzleri*-Prävalenz, wie sie für das geographisch nahegelegene westafrikanische Nigeria gezeigt wurde (Adesiji et al. 2014). Die Bearbeitung der residualen Proben erfolgte mit der Einschränkung der protrahierten Lagerung der extrahierten DNA, unter diagnostischen Routinebedingungen, wodurch unabhängig vom epidemiologischen Ursprung des Probenmaterials, die höchstmögliche Sorgfalt bei der Suche nach dem Zielpathogen gewährleistet ist.

2.4.2 Limitationen

Es fehlt ein kultureller Referenzstandard. Dies ist dem retrospektiven Design der Studie geschuldet, so dass eine kulturelle Erregeranzucht nicht mehr erfolgversprechend durchführbar war. Eine prospektive Studie mit frischem Probenmaterial hätte hinsichtlich eines verlässlichen „Goldstandards“ die gleichen Limitationen bezüglich Sensitivität und Spezifität, die auch für kulturelle Methoden nicht als 100 %-ig angenommen werden können.

Die Wahl der Stämme für die Spiking-Experimente mit den Proben, welche im ersten Schritt der Untersuchung genutzt wurden, war auf die Verfügbarkeit in der multizentrischen Forschungsgruppe beschränkt. Jedoch war das Spiking lediglich zur orientierenden Prüfung der generellen Eignung der ausgewählten PCR-Assays für die Hauptuntersuchung, welche als LCA-Ansatz geplant war, vorgesehen.

Es wurde keine Sequenz-basierte Bestätigungstestung mit den erhaltenen Amplifikaten zur Bestätigung der mittels LCA berechneten diagnostischen Akkuratessse durchgeführt. *GyrA*-PCR-Signale, welche vom Erwartungswert für *A. butzleri* abweichende Ergebnisse in der Schmelzkurvenanalyse zeigten, wurden daher nicht abschließend nachuntersucht.

Es konnten keine Daten zu klinischen Symptomen der untersuchten Patienten in die Studie einbezogen werden, um sie mit den detektierten Ct-Werten zu korrelieren. Dies war den ethischen Rahmenbedingungen der Untersuchung geschuldet. Künftige Studien sollten patientenbezogene Daten einbeziehen, um die klinische Relevanz der gemessenen real-time PCR-Ergebnisse abschätzen zu können.

Das Prinzip der LCA hat als mathematischer Ansatz methodische Voraussetzungen, um eine Verzerrungsfreiheit der Resultate annehmen zu können, welche im Rahmen der Studie nicht zwangsläufig erfüllt waren. Die berechneten Leistungsdaten müssen sich nicht zwangsläufig spezifisch auf *A. butzleri* beziehen, vielmehr betrachtet die LCA eine abstrakte Meta-Struktur, welche die mittels der drei verglichenen PCR-Assays detektierten, genetischen Elemente aufweist. Eine solche Konstellation könnte hypothetisch auch durch eine Kombination von von anderen phylogenetisch nah verwandten Mikroorganismen zustande kommen. Die Vielfalt der beobachteten *gyrA*-Schmelztemperaturen weist darauf hin, dass sich solche phylogenetisch verwandten Bakterien zumindest in Teilen in den ghanaischen Stuhlproben befanden. Auch die Beobachtung von Kreuzreaktivität innerhalb der Gattung *Arcobacter/Aliaerobacter*, welche im ersten Teil der Studie beschrieben wurden, macht diese Option zusätzlich plausibel. Ferner kann die LCA helfen, die Prävalenz einer Population sowie die diagnostische Akkuratessse von diagnostischen Verfahren zu schätzen, aber nicht über die Richtigkeit eines individuellen PCR-Ergebnisses entscheiden.

2.4.3 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass keine der drei untersuchten real-time PCR-Assays uneingeschränkt für den Nachweis von *A. butzleri* geeignet ist. Im Vergleich hatte die *rpoB/C*-PCR die besten Leistungsdaten mit einer Sensitivität von über 95 %, jedoch bei breitem 95 %-Konfidenzintervall, und einer Spezifität von über 98 %. Zu beachten ist, dass der Test nicht sicher zwischen *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* differenzieren kann, was in Regionen mit geringer Prävalenz der letzteren Spezies gegebenenfalls zu vernachlässigen ist. Als Bestätigungstest im Fall eines positiven *rpoB/C*-basierten Screenings, könnte der Einsatz der hochspezifischen

gyrA-PCR in Erwägung gezogen werden. Im Falle einer Bestätigung mit einer *A. butzleri*-spezifischen Schmelztemperatur kann die Diagnose *A. butzleri* als gesichert betrachtet werden. Im Falle eines negativen *gyrA*-PCR-Ergebnisses kann die Diagnose *A. butzleri* durch die niedrige Sensitivität des *gyrA*-Assays nicht zuverlässig ausgeschlossen werden. Aufgrund der beobachteten hohen Prävalenz von *A. butzleri* in ghanaischen Stuhlproben, erscheinen künftige Studien zur ätiologischen Relevanz in der ghanaischen Bevölkerung sinnvoll. In der durchgeführten Studie war bei Fokus auf rein technische Aspekte, dahingehend keine Auswertung möglich.

3. Zusammenfassung

3.1 Deutsche Zusammenfassung

Arcobacter butzleri wird als potentielle Ursache gastrointestinaler Infektionen angesehen. Die wenigsten bislang etablierten Diagnostik-Algorithmen für Stuhlproben von Patienten mit Diarrhoe beinhalten die Suche nach *A. butzleri*, weshalb der Erreger wahrscheinlich oft unentdeckt bleibt und z. B. mittels erregerspezifischer, molekularer Methoden gezielt gesucht werden müsste. In der publizierten Studie wurden drei spezifische real-time PCR-Assays verglichen, welche die Zielgene *hsp60*, *rpoB/C* (jeweils Hybridisierungssonden-Assays) und *gyrA* (Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer-Assay) adressierten. Diese PCR-Verfahren wurden in einem Testvergleich ohne Goldstandard unter Einsatz der indirekten Sensitivitäts- und Spezifitätsschätzung mittels Latent Class-Analyse (LCA) vergleichend evaluiert.

Zur Beurteilung der diagnostischen Genauigkeit der real-time PCR-Assays wurde DNA aus einer ghanaischen Stuhlprobensammlung (1495 Stuhlproben ohne nachgewiesene PCR-Hemmung) mit hoher Prätest-Wahrscheinlichkeit genutzt. Die berechnete Sensitivität und Spezifität betrug 93,0 % und 96,9 % für die *hsp60*-PCR, 100 % und 98,2 % für die *rpoB/C*-PCR, sowie 12,7 % bzw. 99,8 % für die *gyrA*-PCR. Die berechnete *A. butzleri*-Prävalenz innerhalb der ghanaische Bevölkerung lag bei 14,8 %. Wie aus den Testergebnissen der hochtitrig gespikten Proben hervorgeht, können Kreuzreaktionen des *hsp60*-Assays und des *rpoB/C*-Assays mit phylogenetisch eng verwandten Arten wie *A. cryaerophilus* vorkommen, sind jedoch bei phylogenetisch weiter entfernten Arten wie beispielsweise *A. lanthieri*, weniger wahrscheinlich.

Zusammenfassend zeigte der *rpoB/C*-Assay die vielversprechendsten Eigenschaften, war er doch als einziger Assay mit einer Sensitivität von >95 % vergesellschaftet, allerdings verbunden mit einem breiten 95 %-Konfidenzintervall. Darüber hinaus zeigte dieser Assay trotz der bekannten Kreuzreaktivität mit phylogenetisch eng verwandten Arten eine noch akzeptable Spezifität von >98 %. Zur Erhöhung der Spezifität kann eine Bestätigungstestung mit dem *gyrA*-Assay mit einer Spezifität von nahezu 100 % für Proben mit positiven *rpoB/C*-PCR-Ergebnissen im Sinne einer Stufendiagnostik angeschlossen werden. Ein negatives Ergebnis im *gyrA*-Assay schließt, durch dessen sehr geringe Sensitivität, ein Vorhandensein des Erregers in der Probe jedoch nicht zuverlässig aus.

Folgestudien zur ätiologischen Relevanz von *A. butzleri* erscheinen in der ghanaischen Bevölkerung aufgrund der beobachtet hohen Prävalenz von *A. butzleri* in den ghanaischen Residualstuhlproben sinnvoll.

3.2 Englische Zusammenfassung

Potential etiological relevance for gastroenteric disorders has been assigned to *Arcobacter butzleri*. However, standard routine diagnostic algorithms for stool samples of patients with diarrhea are rarely adapted to the detection of this pathogen and so, *A. butzleri* is likely to go undetected unless it is specifically addressed, e.g., by applying pathogen-specific molecular diagnostic approaches. In the study presented here, we compared three real-time PCR assays targeting the genes *hsp60*, *rpoB/C* (both hybridization probe assays) and *gyrA* (fluorescence resonance energy transfer assay) of *A. butzleri* in a test comparison without a reference standard using a stool sample collection with a high pretest probability from the Ghanaian endemicity setting. Latent class analysis was applied with the PCR results obtained with a collection of 1495 stool samples showing no signs of PCR inhibition to assess the real-time PCR assays' diagnostic accuracy.

Calculated sensitivity and specificity were 93.0 % and 96.9 % for the *hsp60*-PCR, 100 % and 98.2 % for the *rpoB/C*-PCR, as well as 12.7 % and 99.8 % for the *gyrA*-PCR, respectively the calculated *A. butzleri* prevalence within the assessed Ghanaian population was 14.7 %. As indicated by test results obtained with high-titer spiked samples, cross-reactions of the *hsp60*-assay and *rpoB/C*-assay with phylogenetically related species such as *A. cryaerophilus* can occur but are less likely with phylogenetically more distant species like, e.g., *A. lanthieri*.

In conclusion, the *rpoB/C*-assay showed the most promising performance characteristics as the only assay with sensitivity >95 %, albeit associated with a broad 95 %-confidence interval. In addition, this assay showed still-acceptable specificity of >98% in spite of the known crossreactivity with phylogenetically closely related species such as *A. cryaerophilus*. The *gyrA*-assay with specificity close to 100 % can be applied for confirmation testing with samples showing positive *rpoB/C*-PCR results. However, in case of a negative result in the *gyrA*-assay, this cannot reliably exclude the detection of *A. butzleri* in the *rpoB/C*-assay due to the *gyrA*-assay's very low sensitivity.

Due to the observed high prevalence of *A. butzleri* in Ghanaian stool samples, future studies on its etiological relevance in the Ghanaian population seem advisable.

4. Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arcobacter</i>
C.	<i>Campylobacter</i>
Ct	Cycle threshold - Zyklusschwellenwert in der Echtzeit-PCR
DNA	Desoxicribonucleic acid - Desoxyribonukleinsäure
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer – Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
KBE	koloniebildenden Einheiten
LCA	Latent class analysis - latente Klassenanalyse
MALDI	Matrix–Assistierte Laser–Desorption–Ionisierung
µL	Mikroliter
PCR	Polymerase Chain Reaction - Polymerasekettenreaktion
spp.	Species pluralis

5. Literaturverzeichnis

- Abdelbaqi et al. 2007 Abdelbaqi, K.; Buissonnière, A.; Prouzet-Mauleon, V.; Gresser, J.; Wesley, I.; Mégraud, F.; Ménard, A. Development of a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR to detect *Arcobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 3015–3021.
- Adesiji et al. 2014 Adesiji, Y.O.; Oloke, J.K.; Emikpe, B.O.; Coker, A.O. *Arcobacter*, an emerging opportunistic food borne pathogen—A review. *Afr. J. Med. Med. Sci.* **2014**, *43*, 5–11.
- Bell et al. 2021 Bell, R.L.; Kase, J.A.; Harrison, L.M.; Balan, K.V.; Babu, U.; Chen, Y.; Macarasin, D.; Kwon, H.J.; Zheng, J.; Stevens, E.L.; et al. The Persistence of Bacterial Pathogens in Surface Water and Its Impact on Global Food Safety. *Pathogens* **2021**, *10*, 1391.
- Bossuyt et al. 2015 Bossuyt, P.M.; Reitsma, J.B.; Bruns, D.E.; Gatsonis, C.A.; Glasziou, P.P.; Irwig, L.; Lijmer, J.G.; Moher, D.; Rennie, D.; de Vet, H.C.; et al. STARD 2015: An updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ* **2015**, *351*, h5527.
- Brightwell et al. 2007 Brightwell, G.; Mowat, E.; Clemens, R.; Boerema, J.; Pulford, D.J.; On, S.L. Development of a multiplex and real time PCR assay for the specific detection of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*. *J. Microbiol. Methods* **2007**, *68*, 318–325.
- Calvo et al. 2013 Calvo, G.; Arias, M.L.; Fernández, H. *Arcobacter*: A foodborne emerging pathogen. *Arch. Latinoam. Nutr.* **2013**, *63*, 164–172.
- Caruso et al. 2019 Caruso, M.; Latorre, L.; Santagada, G.; Fraccalvieri, R.; Difato, L.M.; Miccolupo, A.; Capozzi, L.; Bonerba, E.; Mottola, A.; Parisi, A. *Arcobacter* spp. in bovine milk: An emerging pathogen with potential zoonotic risk. *Ital. J. Food Saf.* **2019**, *7*, 7685.
- Cervenka 2007 Cervenka, L. Survival and inactivation of *Arcobacter* spp., a current status and future prospect. *Crit. Rev. Microbiol.* **2007**, *33*, 101–108.
- Chieffi et al. 2020 Chieffi, D.; Fanelli, F.; Fusco, V. *Arcobacter butzleri*: Up-to-date taxonomy, ecology, and pathogenicity of an emerging pathogen. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19*, 2071–2109.
- Chuan et al. 2022 Chuan, J.; Belov, A.; Cloutier, M.; Li, X.; Khan, I.U.H.; Chen, W. Comparative genomics analysis and virulence-related factors in novel *Aliarcobacter faecis* and *Aliarcobacter lanthieri* species identified as potential opportunistic pathogens. *BMC Genom.* **2022**, *23*, 471.
- Collado et Figueras 2011 Collado, L.; Figueras, M.J. Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2011**, *24*, 174–192.
- de Boer et al. 2013 de Boer, R.F.; Ott, A.; Güren, P.; van Zanten, E.; van Belkum, A.; Kooistra-Smid, A.M. Detection of *Campylobacter* species and *Arcobacter*

- butzleri in stool samples by use of real-time multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, 51, 253–259.
- Dekker et al. 2019 Dekker, D.; Eibach, D.; Boahen, K.G.; Akenten, C.W.; Pfeifer, Y.; Zautner, A.E.; Mertens, E.; Krumkamp, R.; Jaeger, A.; Flieger, A.; et al. Fluoroquinolone-Resistant *Salmonella enterica*, *Campylobacter* spp., and *Arcobacter butzleri* from Local and Imported Poultry Meat in Kumasi, Ghana. *Foodborne Pathog. Dis.* **2019**, 16, 352–358.
- Eberhardt et al. 2015 Eberhardt, K.A.; Sarfo, F.S.; Dompok, A.; Kuffour, E.O.; Geldmacher, C.; Soltan, M.; Schachschneider, M.; Drexler, J.F.; Eis-Hübinger, A.M.; Häussinger, D.; et al. *Helicobacter pylori* Coinfection Is Associated With Decreased Markers of Immune Activation in ART-Naive HIV-Positive and in HIV-Negative Individuals in Ghana. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, 61, 1615–1623.
- Eibach et al. 2016 Eibach, D.; Krumkamp, R.; Hahn, A.; Sarpong, N.; Adu-Sarkodie, Y.; Leva, A.; Käismaier, J.; Panning, M.; May, J.; Tannich, E. Application of a multiplex PCR assay for the detection of gastrointestinal pathogens in a rural African setting. *BMC Infect. Dis.* **2016**, 16, 150.
- Ferreira et al. 2014 Ferreira, S.; Júlio, C.; Queiroz, J.A.; Domingues, F.C.; Oleastro, M. Molecular diagnosis of *Arcobacter* and *Campylobacter* in diarrhoeal samples among Portuguese patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, 78, 220–225.
- Ferreira et al. 2016 Ferreira, S.; Queiroz, J.A.; Oleastro, M.; Domingues, F.C. Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*: A review. *Crit. Rev. Microbiol.* **2016**, 42, 364–383.
- Ferreira et al. 2019 Ferreira, S.; Luís, Â.; Oleastro, M.; Pereira, L.; Domingues, F.C. A meta-analytic perspective on *Arcobacter* spp. antibiotic resistance. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2019**, 16, 130–139.
- Figueras et al. 2014 Figueras, M.J.; Levican, A.; Pujol, I.; Ballester, F.; Rabada Quilez, M.J.; Gomez-Bertomeu, F. A severe case of persistent diarrhoea associated with *Arcobacter cryaerophilus* but attributed to *Campylobacter* sp. and a review of the clinical incidence of *Arcobacter* spp. *New Microbes New Infect.* **2014**, 2, 31–37.
- González et al. 2010 González, A.; Suski, J.; Ferrús, M.A. Rapid and accurate detection of *Arcobacter* contamination in commercial chicken products and wastewater samples by real-time polymerase chain reaction. *Foodborne Pathog. Dis.* **2010**, 7, 327–338.
- González et Ferrús 2011 González, A.; Ferrús, M.A. Study of *Arcobacter* spp. contamination in fresh lettuces detected by different cultural and molecular methods. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, 145, 311–314.
- Goodman 2002 Goodman, L.A. Latent class analysis: The empirical study of latent types, latent variables, and latent structures. In *Applied Latent Class Analysis*;

- Hagenaars, J.A., McCutcheon, A.L., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, **2002**; pp. 3–55.
- Hahn et al. 2020 Hahn, A.; Podbielski, A.; Meyer, T.; Zautner, A.E.; Loderstädt, U.; Schwarz, N.G.; Krüger, A.; Cadar, D.; Frickmann, H. On detection thresholds—A review on diagnostic approaches in the infectious disease laboratory and the interpretation of their results. *Acta Trop.* **2020**, *205*, 105377.
- Hänel et al. 2016 Hänel, I.; Tomaso, H.; Neubauer, H. Arcobacter—An underestimated zoonotic pathogen? *Bundesgesundheitsblatt Gesundh. Gesundh.* **2016**, *59*, 789–794.
- Hausdorf et al. 2013 Hausdorf, L.; Neumann, M.; Bergmann, I.; Sobiella, K.; Mundt, K.; Fröhling, A.; Schlüter, O.; Klocke, M. Occurrence and genetic diversity of Arcobacter spp. in a spinach-processing plant and evaluation of two Arcobacter-specific quantitative PCR assays. *Syst. Appl. Microbiol.* **2013**, *36*, 235–243.
- Ho et al. 2006 Ho, H.T.; Lipman, L.J.; Gaastra, W. Arcobacter, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! *Vet. Microbiol.* **2006**, *115*, 1–13.
- Hsu et Lee 2015 Hsu, T.T.; Lee, J. Global Distribution and Prevalence of Arcobacter in Food and Water. *Zoonoses Public Health* **2015**, *62*, 579–589.
- Iwu et al. 2021 Iwu, C.D.; Ekundayo, T.C.; Okoh, A.I. A Systematic Analysis of Research on Arcobacter: Public Health Implications from a Food-Environment Interphase Perspective. *Foods* **2021**, *10*, 1673.
- Kerkhof et al. 2020 Kerkhof, P.J.; Van den Abeele, A.M.; Strubbe, B.; Vogelaers, D.; Vandamme, P.; Houf, K. Diagnostic approach for detection and identification of emerging enteric pathogens revisited: The (Ali)arcobacter lanthieri case. *New Microbes New Infect.* **2020**, *39*, 100829.
- Kiehlbauch et al. 1991 Kiehlbauch, J.A.; Brenner, D.J.; Nicholson, M.A.; Baker, C.N.; Patton, C.M.; Steigerwalt, A.G.; Wachsmuth, I.K. Campylobacter butzleri sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness. *J. Clin. Microbiol.* **1991**, *29*, 376–385.
- Kim et al. 2019 Kim, N.H.; Park, S.M.; Kim, H.W.; Cho, T.J.; Kim, S.H.; Choi, C.; Rhee, M.S. Prevalence of pathogenic Arcobacter species in South Korea: Comparison of two protocols for isolating the bacteria from foods and examination of nine putative virulence genes. *Food Microbiol.* **2019**, *78*, 18–24.
- Krumkamp et al. 2015 Krumkamp, R.; Sarpong, N.; Schwarz, N.G.; Adlkofer, J.; Loag, W.; Eibach, D.; Hagen, R.M.; Adu-Sarkodie, Y.; Tannich, E.; May, J. Gastrointestinal infections and diarrheal disease in Ghanaian infants and children: An outpatient case-control study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0003568.

- Landis et Koch 1977 Landis, J.R.; Koch, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **1977**, *33*, 159–174.
- Lau et al. 2002 Lau, S.K.; Woo, P.C.; Teng, J.L.; Leung, K.W.; Yuen, K.Y. Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of *Arcobacter butzleri* bacteraemia in a patient with acute gangrenous appendicitis. *Mol. Pathol.* **2002**, *55*, 182–185.
- Lee et al. 2012 Lee, C.; Agidi, S.; Marion, J.W.; Lee, J. *Arcobacter* in Lake Erie beach waters: An emerging gastrointestinal pathogen linked with human-associated fecal contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 5511–5519.
- Lehner et al. 2005 Lehner, A.; Tasara, T.; Stephan, R. Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *102*, 127–135.
- Levican et Figueras 2013 Levican, A.; Figueras, M.J. Performance of five molecular methods for monitoring *Arcobacter* spp. *BMC Microbiol.* **2013**, *13*, 220.
- Liu et al. 2018 Liu, L.; Cloutier, M.; Craiovan, E.; Edwards, M.; Frey, S.K.; Gottschall, N.; Lapen, D.R.; Sunohara, M.; Topp, E.; Khan, I.U.H. Quantitative real-time PCR-based assessment of tile drainage management influences on bacterial pathogens in tile drainage and groundwater. *Sci. Total Environ.* **2018**, *624*, 1586–1597.
- López-Vélez et al. 2022 López-Vélez, R.; Lebens, M.; Bundy, L.; Barriga, J.; Steffen, R. Bacterial travellers' diarrhoea: A narrative review of literature published over the past 10 years. *Travel Med. Infect. Dis.* **2022**, *47*, 102293.
- Marta et al. 2020 Marta, C.; Giovanni, N.; Angela, M.; Loredana, C.; Elisabetta, B.; Laura, D.; Anna, M.; Angela, D.P.; Gianfranco, S.; Antonio, P. Large genetic diversity of *Arcobacter butzleri* isolated from raw milk in Southern Italy. *Food Microbiol.* **2020**, *89*, 103403.
- Meng et Doyle 1997 Meng, J.; Doyle, M.P. Emerging issues in microbiological food safety. *Annu. Rev. Nutr.* **1997**, *17*, 255–275.
- Miltenburg et al. 2020 Miltenburg, M.G.; Cloutier, M.; Craiovan, E.; Lapen, D.R.; Wilkes, G.; Topp, E.; Khan, I.U.H. Real-time quantitative PCR assay development and application for assessment of agricultural surface water and various fecal matter for prevalence of *Aliarcobacter faecis* and *Aliarcobacter lanthieri*. *BMC Microbiol.* **2020**, *20*, 164.
- Minaeva et al. 2006 Minaeva, N.Z.; Minaev, V.I.; Sokolov, A.A.; Avilova, N.D.; Mitrokhin, S.D. Bacteria of the genus *Arcobacter*, a new etiological factor of nosocomial infections. *Antibiot. Khimioter.* **2006**, *51*, 18–22.
- Niesters 2001 Niesters, H.G. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods* **2001**, *25*, 419–429.
- Pérez-Cataluña et al. 2018 Pérez-Cataluña, A.; Salas-Massó, N.; Diéguez, A.L.; Balboa, S.; Lema, A.; Romalde, J.L.; Figueras, M.J. Revisiting the Taxonomy of the Genus

- Arcobacter: Getting Order From the Chaos. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2077.
- Pérez-Cataluña et al. 2019 Pérez-Cataluña, A.; Salas-Massó, N.; Diéguez, A.L.; Balboa, S.; Lema, A.; Romalde, J.L.; Figueras, M.J. Corrigendum (2): Revisiting the Taxonomy of the Genus *Arcobacter*: Getting Order from the Chaos. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2253.
- Qu et al. 1996 Qu, Y.; Tan, M.; Kutner, M.H. Random effects models in latent class analysis for evaluating accuracy of diagnostic tests. *Biometrics* **1996**, *52*, 797–810.
- Ramees et al. 2017 Ramees, T.P.; Dhama, K.; Karthik, K.; Rathore, R.S.; Kumar, A.; Saminathan, M.; Tiwari, R.; Malik, Y.S.; Singh, R.K. *Arcobacter*: An emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control—A comprehensive review. *Vet. Q.* **2017**, *37*, 136–161.
- Sarfo et al. 2015 Sarfo, F.S.; Eberhardt, K.A.; Dompok, A.; Kuffour, E.O.; Soltau, M.; Schachscheider, M.; Drexler, J.F.; Eis-Hübinger, A.M.; Häussinger, D.; Oteng-Seifah, E.E.; et al. *Helicobacter pylori* Infection Is Associated with Higher CD4 T Cell Counts and Lower HIV-1 Viral Loads in ART-Naïve HIV-Positive Patients in Ghana. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0143388.
- Shange et al 2019 Shange, N.; Gouws, P.; Hoffman, L.C. *Campylobacter* and *Arcobacter* species in food-producing animals: Prevalence at primary production and during slaughter. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *35*, 146.
- Shrestha et al. 2018 Shrestha, R.G.; Tanaka, Y.; Malla, B.; Tandukar, S.; Bhandari, D.; Inoue, D.; Sei, K.; Sherchand, J.B.; Haramoto, E. Development of a Quantitative PCR Assay for *Arcobacter* spp. and its Application to Environmental Water Samples. *Microbes Environ.* **2018**, *33*, 309–316.
- Snelling et al. 2006 Snelling, W.J.; Matsuda, M.; Moore, J.E.; Dooley, J.S. Under the microscope: *Arcobacter*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2006**, *42*, 7–14.
- Vandamme et al. 1991 Vandamme, P.; Falsen, E.; Rossau, R.; Hoste, B.; Segers, P.; Tytgat, R.; De Ley, J. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: Emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1991**, *41*, 88–103
- Vandamme et al. 1992 Vandamme, P.; Vancanneyt, M.; Pot, B.; Mels, L.; Hoste, B.; Dewettinck, D.; Vlaes, L.; van den Borre, C.; Higgins, R.; Hommez, J.; et al. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1992**, *42*, 344–356.
- Vandamme et Goossens 1992 Vandamme, P.; Goossens, H. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter*: A review. *Zentralbl. Bakteriol.* **1992**, *276*, 447–472
- Whiteduck-Léveillé et Whiteduck-Léveillé, K.; Whiteduck-Léveillé, J.; Cloutier, M.; Tambong,

- al. 2015 J.T.; Xu, R.; Topp, E.; Arts, M.T.; Chao, J.; Adam, Z.; André Lévesque, C.; et al. *Arcobacter lanthieri* sp. nov., isolated from pig and dairy cattle manure. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2015**, 65, 2709–2716.
- Zambri et al 2019 Zambri, M.; Cloutier, M.; Adam, Z.; Lapen, D.R.; Wilkes, G.; Sunohara, M.; Topp, E.; Talbot, G.; Khan, I.U.H. Novel virulence, antibiotic resistance and toxin gene-specific PCR-based assays for rapid pathogenicity assessment of *Arcobacter faecis* and *Arcobacter lanthieri*. *BMC Microbiol.* **2019**, 19, 11.
- Zautner et al. 2023 Zautner, A.E.; Riedel, T.; Bunk, B.; Spröer, C.; Boahen, K.G.; Akenten, C.W.; Dreyer, A.; Färber, J.; Kaasch, A.J.; Overmann, J.; et al. Molecular characterization of *Arcobacter butzleri* isolates from poultry in rural Ghana. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2023**, 13, 1094067.

6. Erklärung des Eigenanteils

Die Arbeit wurde am Fachbereich Tropenmedizin des Bundeswehrkrankenhauses Hamburg im Bernhard-Nocht-Institut Hamburg unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Holger Rohde vom Institut für Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Uniklinikums Hamburg Eppendorf, Herrn PD Dr. Ralf Matthias Hagen und Herrn Prof. (APL) Dr. Hagen Frickmann durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. (APL) Dr. Hagen Frickmann, PD. Dr. Ralf Matthias Hagen, Prof. Dr. Holger Rohde und Dr. Ulrike Loderstädt.

Die Aufbereitung der gespikten Proben sowie die molekularbiologische Analyse aller Patientenproben erfolgte mit fachlicher Unterstützung durch die oben genannten Betreuer sowie die Mitarbeiterinnen des Fachbereichs Tropenmedizin Annett Michel und Simone Priesnitz durch mich persönlich.

Eine Auswertung und Beurteilung der gewonnenen PCR-Ergebnisse sowie die Pflege der Daten in eine Excel-Tabelle erfolgte durch mich persönlich. Die Daten wurden durch mich auf Vollständigkeit geprüft und die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach Beratung durch Herrn Prof. (APL) Dr. Hagen Frickmann. Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Unterstützung durch die Herrn PD Dr. Andreas Hahn und Prof. (APL) Dr. Hagen Frickmann.

Am gemeinsam verfassten Artikel hatte ich als Erstautorin einen wesentlichen Anteil.

Ich versichere, keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen, verwendet zu haben.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir während der Erstellung meiner Doktorarbeit zur Seite standen.

In erster Linie gilt mein Dank Prof. Dr. Rohde und Prof. Dr. Hagen für stets schnelle unkomplizierte Unterstützung mit konstruktiver Kritik und fachlicher Expertise.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei meinem wissenschaftlichen Betreuer vor Ort, Prof. (APL) Dr. Frickmann, für den unermüdlichen Zuspruch, die Beratung sowie die Bereitstellung der Arbeitsumgebung nebst Materialien sowie technischer Assistenz von Fr. Priesnitz und Fr. Michel.

Ich danke meinen Kolleginnen für die Entlastung, Motivation und Unterstützung.

Mit herzlichem Dank bedanke ich auch alle meine Lieben, die mich in jeder Lebenslage begleiten und unterstützen.

8. Lebenslauf

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

Publikationen

Binder, R.; Hahn, A.; Eberhardt, K.A.; Hagen, R.M.; Rohde, H.; Loderstädt, U.; Feldt, T.; Sarfo, F.S.; Di Cristanziano, V.; Kahlfuss, S.; et al. Comparison of the Diagnostic Accuracy of Three Real-Time PCR Assays for the Detection of *Arcobacter butzleri* in Human Stool Samples Targeting Different Genes in a Test Comparison without a Reference Standard. *Microorganisms* 2023, 11, 1313.

9. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: