

**Aus der Klinik für Tropenmedizin des
Klinikums Würzburg Mitte
Chefarzt: Professor Dr. med. August Stich**

Prävalenz intestinaler Protozoeninfektionen in Ijinga Island, Tansania

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**



**vorgelegt von
Clemens Thomas Mechler
aus Grebenhain**

Würzburg 2020

Referent: Prof. Dr. med. August Stich
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Klaus Brehm
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2020

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Intestinale Protozoeninfektionen	1
1.1.1 <i>Giardia intestinalis</i>	1
1.1.2 <i>Entamoeba histolytica</i>	5
1.2 Transmission und Prävention intestinaler Protozoeninfektionen	10
1.2.1 Transmission und Risikofaktoren	10
1.2.2 Prävention und WASH	11
1.3 Eingliederung in das SchistoControl Pilotprojekt	12
1.4 Fragestellungen und Zielsetzung	13
1.4.1 Zusammenfassende Problemstellung.....	13
1.4.2 Hypothesen und Fragestellungen	14
1.4.3 Zielsetzung.....	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Materialien	17
2.1.1 Liste der verwendeten Chemikalien	17
2.1.2 Liste der verwendeten Geräte.....	17
2.1.3 Liste der Verbrauchsmaterialien	18
2.1.4 Primer und Sonden	19
2.1.5 Lösungen und Kits	20
2.1.6 Positivkontrollen.....	21
2.1.7 Computer und Software	21
2.2 Patienten und Methoden	21
2.2.1 Studiendesign und Fallzahlberechnung	21
2.2.2 Studienort.....	22
2.2.3 Medikamentöse Therapie	23
2.2.4 Studienpopulation	24
2.2.5 Gewinnung der Stuhlproben	25
2.2.6 Kato-Katz Präparate	25
2.2.7 CCA Schnelltest.....	26

2.2.8	Aufbereitung der Stuhlproben mittels SAF Technik	27
2.2.9	Lichtmikroskopie	28
2.2.10	DNA-Extraktion aus den Stuhlproben	28
2.2.11	PCR und Real-Time PCR	29
2.2.12	Statistik	34
2.2.13	Ethische Richtlinien.....	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Studienpopulation (Teilnehmer).....	36
3.1.1	Charakterisierung der Studienteilnehmer	36
3.1.2	Demografische Basisdaten und deskriptive Analyse der Studienpopulation	38
3.2	Prävalenzdaten.....	40
3.2.1	Prävalenz <i>G. intestinalis</i> , <i>E. histolytica</i> und <i>E. dispar</i>	40
3.2.2	Prävalenz STH, Schistosomiasis und anderer Protozoen	44
3.3	Prävalenzen von <i>G. intestinalis</i> und <i>E. dispar</i> in Bezug auf Alter und Geschlecht der Studienteilnehmer	45
3.3.1	<i>G. intestinalis</i> und <i>E. dispar</i> Infektionen nach Altersmittelwerten	45
3.3.2	Altersspezifische Prävalenz <i>G. intestinalis</i>	47
3.3.3	Altersspezifische Prävalenz <i>E. dispar</i>	48
3.3.4	Einfluss des Alters und des Geschlechts auf Protozoeninfektionen	50
3.4	Prävalenz Amöbenleberabszesse	51
3.5	Polyparasitismus	51
3.6	Infektionen mit Schistosomiasis	53
3.7	Testsensitivität.....	53
4	Diskussion	55
4.1	Diskussion des Studienkollektivs	56
4.2	Diskussion der Methodik	56
4.2.1	Nachweis von Protozoen- und Helmintheninfektionen	56
4.2.2	Nachweis <i>S. mansoni</i>	58
4.2.3	Einschränkungen und Limitationen der Studie	59
4.3	Diskussion der Prävalenzdaten.....	60
4.3.1	Prävalenz von <i>G. intestinalis</i>	60
4.3.2	Prävalenz und Differenzierung von <i>E. histolytica</i> und <i>E. dispar</i>	61
4.3.3	Prävalenz von STH und apathogenen Protozoen.....	64

4.4	Prävalenz <i>S. mansoni</i> und Koinfektionen	66
4.5	Prävalenz <i>G. intestinalis</i> und <i>E. dispar</i> in Bezug auf Alter und Geschlecht	67
4.6	Protozoeninfektionen und WASH.....	69
4.7	Ausblick	72
5	Zusammenfassung.....	73
6	Literaturverzeichnis	75
	Annex I: Addendum.....	88
	Annex II: Physische Karte Tansania und Magu Distrikt	91
	Annex III: Karte Ijinga Island	92

Abkürzungsverzeichnis

ALA	Amebic liver abscess
Ct	Cycle threshold
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure/Desoxyribonucleic acid
<i>E.</i>	<i>Entamoeba</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
<i>G.</i>	<i>Giardia</i>
g	Gramm
kDa	Kilodalton
km	Kilometer
kg	Kilogramm
KI	Konfidenzintervall
LDC	Least Developed Countries
MDA	Mass drug administration
µmol	Mikromol
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
NTD	Neglected Tropical Disease
PCR	Polymerase chain reaction
PHAST	Participatory Hygiene And Sanitation Transformation
pmol	Piccomol
PBS	Phosphate buffered saline
POC-CCA	Point of care - circulating cathodic antigen
qPCR	Quantitative realtime polymerase chain reaction
SAF	Sodium Acetic Acid Formalin
SDG	Sustainable Development Goals
STH	Soil transmitted helminths
Upm	Umdrehungen pro Minute
WASH	Water, Sanitation and Hygiene
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Intestinale Protozoeninfektionen

Intestinale Infektionen mit pathogenen Protozoen können schwere Erkrankungsbilder verursachen und stellen eine oftmals vernachlässigte Problematik, vor allem in Regionen mit geringen Sanitär- und Hygienestandards, dar. Dies betrifft insbesondere südlich der Sahara gelegene Länder. Hier existieren leider keine oder nur unzureichende Prävalenzdaten, was zum Teil auch auf die inadäquaten diagnostischen Möglichkeiten zurückzuführen ist. Die Übertragung erfolgt fäkal-oral über verunreinigte Nahrungsmittel sowie kontaminiertes Trinkwasser und kann symptomatische und asymptomatische, akute und chronische Infektionen hervorrufen. Als wichtige und häufige Vertreter pathogener intestinaler Protozoeninfektionen werden im Folgenden *Giardia intestinalis* (*G. intestinalis*) und *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) genauer beschrieben.

1.1.1 *Giardia intestinalis*

1.1.1.1 Epidemiologie

Aktuell sind kaum Daten zur Verbreitung der Giardiasis außerhalb der Vereinigten Staaten von Amerika und Europas vorhanden. Nur vereinzelt werden von Zeit zu Zeit Studien zu regionalen Prävalenzerhebungen veröffentlicht. Während sich die Infektionsrate in Europa über die letzten Jahre allgemein betrachtet auf einem konstanten Niveau hielt, zeichnete sich doch eine höhere Prävalenz in Süd- und Osteuropa ab. Als Gründe hierfür werden neben Hygieneverhältnissen auch Medikamentenresistenzen sowie der Einfluss des Klimawandels diskutiert (ECDC, 2016).

Infektionen mit *G. intestinalis* sind jedoch weltweit verbreitet und kommen gehäuft in den Tropen vor. Hiervon sind vor allem Länder betroffen, in denen niedrigere hygienische Verhältnisse herrschen (Feng und Xiao, 2011). Schätzungen der WHO gehen davon aus, dass um die Jahrtausendwende etwa 200 Millionen Menschen weltweit an einer symptomatischen Infektion litten und jedes Jahr circa 500.000 Neuerkrankungen hinzukommen (WHO, 1996).

Während in Ländern der westlichen Welt überwiegend Prävalenzen von unter 5 % zu verzeichnen sind, rangiert die Prävalenz von *G. intestinalis* in weniger und am wenigsten entwickelten Ländern (LDC) mit deutlichen regionalen Unterschieden etwa zwischen 8-30 % (Feng und Xiao, 2011). Während beispielsweise Johnston *et al.* in ländlichen Gegenden in Uganda eine Prävalenz von über 40 % detektierten, lag die Prävalenz in einer Querschnittsstudie bei Kindern in Tadschikistan bei 26,4 % (Johnston *et al.*, 2010; Matthys *et al.*, 2011). In drei Bezirken im Süden der Elfenbeinküste hingegen erhoben Coulibaly *et al.* eine Prävalenz von 13 % (Coulibaly *et al.*, 2018). Bezogen auf Tansania, wo die Datenerhebung dieser Dissertationsarbeit durchgeführt wurde, finden sich ebenfalls nur wenige Prävalenzdaten. Untersuchungen von Speich *et al.* bei Schulkindern auf Pemba Island ergaben eine Prävalenz von 16,4 %, wohingegen Mazigo *et al.* im Großraum Mwanza eine deutlich geringere Prävalenz von 6,9 % erheben konnten (Mazigo *et al.*, 2010; Speich *et al.*, 2013).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der verschiedenen Studien jedoch, dass die Infektionen mit *G. intestinalis* ein weit verbreitetes und vor allem in LDCs ein unterschätztes Problem darstellen.

1.1.1.2 Erreger und Pathophysiologie

Giardia intestinalis (synonym auch *Giardia duodenalis* oder *Giardia lamblia*) ist ein Protozoon aus der Gruppe der Metamonaden, welches als Trophozoit oder Zyste vorkommen kann. Evolutionsbiologisch hat *Giardia* als ursprünglicher eukaryoter Organismus große Ähnlichkeit mit anaeroben Prokaryoten (Plutzer *et al.*, 2010). Das Trophozoitenstadium stellt die aktive und fortpflanzungsfähige

Form des Erregers dar. Trophozoiten sind oval- bis birnenförmig, etwa 10-20 µm lang und besitzen acht Geißeln sowie zwei beidseits der Längsachse gelegene Kerne. Die Zyste fungiert als resistente Dauerform, welche teilweise über Monate hinweg überlebensfähig bleiben kann. Zysten sind oval, 10-14 µm lang und besitzen vier Zellkerne.

Die Infektion erfolgt über die Ingestion der Zysten mit kontaminierter Nahrung oder Trinkwasser, wobei die minimale Infektionsdosis mit 10-25 Zysten sehr gering ist. Nach der oralen Aufnahme erfolgt die Exzystierung im Magen und unter den Einflüssen von Magensäure und Pankreasenzymen die Umwandlung in Trophozoiten im proximalen Jejunum. Dort binden sie mit ihrer Adhärenzscheibe an das Bürstensaumepithel der Mukosa. Der Pathomechanismus wird bislang nur teilweise verstanden. Während eine Invasion der Mukosa sowie eine Enterotoxinproduktion bisher nicht beobachtet werden konnte, wird eine Störung der Enterozytenbarriere durch die Trophozoiten diskutiert (Chin *et al.*, 2002). Durch Einwanderung von Entzündungszellen werden außerdem enterische Disaccharidasen gehemmt, was zu Resorptionsstörungen und Durchfällen führt (Benere *et al.*, 2012). Begünstigt wird eine Malabsorption zudem durch den Abbau von Gallensalzen durch die Trophozoiten. Als histologisches Korrelat einer Infektion zeigen sich bei einigen Patienten Kryptenhyperplasien sowie Zottenatrophien. Nach drei bis vier Wochen wandeln sich die Trophozoiten dann wieder in Zysten um und werden mit dem Stuhl ausgeschieden. Hier können sie in feuchter Umgebung Wochen bis Monate überdauern und bei erneuter Aufnahme zu einer weiteren Infektion führen (Mims *et al.*, 2006; Suerbaum *et al.*, 2016).

Es existieren insgesamt acht Genotypen von denen zwei, Genotypen A und B, sowohl human - also auch zoopathogen sind, die anderen Genotypen scheinen nach aktuellen Erkenntnissen wirtsspezifisch zu sein (Feng und Xiao, 2011).

1.1.1.3 Klinik und Verlauf

Neben leichten Infektionen, welche auch asymptomatisch verlaufen können, treten bei schwereren Infektionen zumeist 2-10 Tage nach der Infektion voluminöse, breiig-wässrige Diarrhoen auf. Begleitet werden die Durchfälle zumeist von abdominellen Schmerzen, Magenkrämpfen und Meteorismus. Neben der häufigen akuten und selbstlimitierenden Verlaufsform können auch chronische Infektionen mit rezidivierenden Diarrhoen, Malabsorption und Gewichtsverlust auftreten. So können bei Kindern, bedingt durch chronische Malabsorption, auch Wachstumsstörungen und Störungen der geistigen Entwicklung auftreten. Zudem können Infektionen bei bestehender Immunsuppression oder Immundefizienz zu schweren bis hin zu tödlichen Verläufen führen. Erbrechen, Blutbeimengungen im Stuhl oder Fieber sprechen hingegen gegen eine Infektion mit *G. intestinalis*.

1.1.1.4 Diagnostik und Therapie

Goldstandard in der Diagnostik von *G. intestinalis* ist der mikroskopische Nachweis von Zysten oder Trophozoiten im Stuhl. Zudem besteht die Möglichkeit des Antigennachweises mittels ELISA sowie der direkte Nachweis von *Giardia*-DNA mittels PCR. Als weiterführende Diagnostik zur Abklärung von Differentialdiagnosen der chronischen Diarrhoe kann bei fehlendem Erregernachweis und Progredienz der Beschwerden eine endoskopische Untersuchung mit gleichzeitiger Biopsie erwogen werden (Mims *et al.*, 2006; Suerbaum *et al.*, 2016).

Therapeutisch stehen zunächst symptomatische Maßnahmen im Vordergrund. Hierzu gehören in erster Linie Rehydratation sowie eine analgetische und spasmolytische Therapie. Die medikamentöse Erstlinientherapie der Giardieninfektionen besteht meist in der Gabe von Nitroimidazolpräparaten wie Metronidazol, Tinidazol, Secnidazol und anderen. Auch das Benzimidazolpräparat Albendazol zeigt eine Aktivität und stellt eine

therapeutische Alternative dar (Gardner und Hill, 2001). Bei Patienten mit selektivem Immunglobulin-A-Mangel stellen Infektionen mit *G. intestinalis* aufgrund der abwehrgeschwächten Darmmukosa ein großes Problem dar, da hier die medikamentöse Therapie oft nur unzureichend greift.

1.1.2 *Entamoeba histolytica*

1.1.2.1 Epidemiologie

Bei der Betrachtung der geografischen Verbreitung von Amöbeninfektionen wird ähnlich wie bei *G. intestinalis* ein endemisches Auftreten in LDCs der Tropen und Subtropen beobachtet, da auch hier die schlechteren Hygienebedingungen den wichtigsten Risikofaktor für eine Übertragung der Infektion darstellen. Obwohl vorzeitige Todesfälle durch infektiöse Durchfallerkrankungen in den letzten Jahrzehnten weltweit deutlich rückläufig waren, ist die Zahl der Neuinfektionen mit *E. histolytica* weiterhin hoch. Schwere bis tödliche Verläufe sind auf die Komplikationen der Infektion, vor allem auf Amöbenleberabszesse (ALA) zurückzuführen. Langzeitstudien zeigen, dass jährlich etwa 55000 Menschen an den Folgen einer invasiven Amöbiasis versterben, was die besondere Relevanz dieser Infektionskrankheit verdeutlicht (Alam *et al.*, 2014; Lozano *et al.*, 2012; WHO, 1997).

Hinsichtlich der Epidemiologie ist es von großer Bedeutung, Infektionen mit *E. histolytica* von denen mit *Entamoeba dispar* (*E. dispar*) zu unterscheiden. *E. dispar* gilt als apathogenes Protozoon ohne invasives Potenzial (Clark, 1998).

Da es in der Stuhlprobe unter dem Lichtmikroskop nicht von *E. histolytica* unterschieden werden kann, sind zur Differenzierung molekulargenetische oder biochemische Maßnahmen vonnöten. Hierbei hat sich die PCR als sensitivste und spezifischste Nachweismethode erwiesen (Britten *et al.*, 1997). Problematisch erscheint allerdings unter diesem Gesichtspunkt, dass in den meisten Studien in den Tropen und Subtropen die Stuhlmikroskopie als Nachweisinstrument verwendet wird und somit die Prävalenzdaten oftmals nur

als gemeinsame Prävalenz von *E. histolytica* und *E. dispar* angegeben werden können.

Die bekannten Prävalenzdaten von *E. histolytica/dispar* variieren von rund 5 % in drei Bezirken im Süden der Elfenbeinküste bis hin zu 25,9 % bei Kindern in einer ländlichen Gegend in Tadschikistan (Coulibaly *et al.*, 2018; Matthys *et al.*, 2011).

Zur häufigsten und schwerwiegendsten Komplikation einer Infektion zählt der Amöbenleberabszess. Daten aus verschiedenen Regionen zeigen, dass Amöbenleberabszesse unter anderem endemisch in Teilen Bangladeschs (Alam *et al.*, 2014) im Norden Sri Lankas (Kannathasan *et al.*, 2018) sowie im Bundesstaat Sonora in Mexico (Hernandez *et al.*, 2015) vorkommen.

Auch bezüglich der Morbidität von Amöbeninfektionen sind nur wenige Daten aus Tansania zu finden. Bei zuvor erwähnter Untersuchung von Kindern auf Pemba Island konnte eine Prävalenz von *E. histolytica/dispar* von 18 % festgestellt werden (Speich *et al.*, 2013). Mazigo *et al.* konnten bei ihrer Erhebung in Mwanza eine Prävalenz von 13,6 % detektieren, beide Studien nutzten allerdings ausschließlich den lichtmikroskopischen Erregernachweis (Mazigo *et al.*, 2010). Interessanterweise fanden Studien bei einer Population im Norden des Iran sowie bei Kindern in Dar es Salam in Tansania keine Infektionen mit *E. histolytica*, wobei diese Studien zur Unterscheidung der Amöbenspezies die PCR herangezogen hatten (Shahdoust *et al.*, 2016; Tellevik *et al.*, 2015).

Hingegen wurden bei einer Studie in Nordindien ebenfalls nach PCR Diskrimination 13,7 % der Studienpopulation positiv auf *E. histolytica* getestet (Nath *et al.*, 2015).

1.1.2.2 Erreger und Pathophysiologie

Entamoeba histolytica ist ein Protozoon aus der Familie der Entamoebidae und Verursacher der Amöbenruhr, welche auch als intestinale Amöbiasis bezeichnet wird. Die Übertragung erfolgt fäkal-oral über die Aufnahme von 10-15 µm großen Zysten vorwiegend in kontaminiertem Trinkwasser oder Nahrungsmitteln und wird durch mangelhafte hygienische Bedingungen begünstigt. Die rundlichen, infektiösen Zysten besitzen im reifen Stadium vier Zellkerne und können in kühlem und feuchtem Milieu zum Teil über Monate hinweg überleben. Nach der oralen Aufnahme entwickeln sich während der Passage des terminalen Ileums aus den Zysten die im Durchmesser 10-50 µm großen Trophozoiten, welche an der Oberfläche Pseudopodien zur Fortbewegung und Nahrungsaufnahme ausbilden. Sie vermehren sich durch Zweiteilung und können so rapide das Kolonlumen besiedeln. Die Trophozoiten werden in zwei Formen unterschieden. Nichtinvasive Trophozoiten werden auch als Minuta-Formen bezeichnet und verbleiben im Darmlumen, wohingegen invasive Trophozoiten als Magna-Formen bezeichnet werden. Letztere fallen histologisch durch phagozytierte Erythrozyten im Inneren auf und sind Verursacher der Amöbiasis. Im Kolonlumen können sich nichtinvasive Trophozoiten wieder enzystieren und nach Ausscheidung über den Stuhl erneut Infektionen hervorrufen. Invasive Trophozoiten binden an die Kolonmukosa und produzieren unterschiedliche Virulenzfaktoren, welche zunächst oberflächliche Läsionen verursachen. In der Folge können Caspasen und weitere Faktoren Apoptose und Nekrose induzieren, was die Lyse der Epithelzellen sowie eine Inflammationsreaktion zur Folge hat. Makroskopisch zeigt sich in der späten Phase der Infektion eine entzündete Mukosa mit tiefen Ulzerationen. Destruktionen von betroffenen Blutgefäßen führen zu blutigen Diarrhoen, welche in der Literatur oft als für die Amöbiasis typischen „Himbeergeleestühle“ beschrieben werden (Espinosa-Cantellano und Martinez-Palomo, 2000). Penetrieren Trophozoiten im Zuge der Gewebsdestruktion das venöse Gefäßgeflecht um den Darm, können sie über hämatogene Streuung in das Pfortadersystem und somit in die Leber gelangen. Dort angekommen, können sie eine Kolliquationsnekrose induzieren und so

einen lebensgefährlichen Leberabszess verursachen. Eine solche Abszessbildung ist auch in anderen Organen, wie dem Gehirn, der Lunge und den Nieren möglich, sollten Trophozoiten über das Blut oder durch die Ruptur eines Primärabszesses dorthin gelangen (Harries, 1982).

1.1.2.3 Klinik und Verlauf

Bei der invasiven Verlaufsform unterscheidet man die intestinale Amöbiasis von der extraintestinalen Amöbiasis.

Die intestinale Form macht sich nach einer Inkubationszeit von 1-4 Wochen zunächst durch abdominelle Schmerzen, Krämpfe und breiig-schleimige Diarrhoen mit Blutbeimengung bemerkbar. Im Verlauf treten häufig Fieber, Schwächegefühl und Gewichtsverlust auf. Als Komplikationen können in seltenen Fällen eine nekrotisierende Enterokolitis, ein toxisches Megakolon oder auch Perforationen der Darmwand auftreten (Harries, 1982). Ebenfalls eine Komplikation der intestinalen Amöbiasis ist die Ausbildung der extraintestinalen Verlaufsform. Diese imponiert in den meisten Fällen als Amöbenleberabszess (ALA), kann aber in seltenen Fällen auch Abszedierungen in anderen Organen zur Folge haben. Ein ALA kann noch Monate bis Jahre nach der eigentlichen Infektion auftreten und äußert sich initial durch ein allgemeines Schwächegefühl, Fieber und Schmerzen im rechten Oberbauch. Durch Abszessrupturen besteht die Gefahr von Peritonitiden und anderen Komplikationen mit hoher Letalität (Stanley, 2003).

1.1.2.4 Diagnostik

Der Nachweis von Trophozoiten erfolgt mikroskopisch in der frischen, noch warmen Stuhlprobe, da diese sehr fragil sind und sich meist innerhalb einer Stunde zersetzen. Oft sind wiederholte Untersuchungen des frischen Stuhls erforderlich. Bewegliche Trophozoiten mit phagozytierten Erythrozyten im Inneren

gelten dabei als beweisend für eine invasive intestinale Infektion mit *E. histolytica*. Zysten lassen sich unabhängig vom Zeitpunkt der Stuhlabgabe auch im fixierten Stuhl beobachten, allerdings ist eine Unterscheidung zu den apathogenen *E. dispar* und *E. moshkovskii* nicht möglich. Auch sind verschiedene ELISA Antigentests erhältlich, die aber eine geringere Sensitivität und Spezifität als die Stuhl-PCR aufweist, weswegen letztere vorzugsweise zur Differenzierung der Amöbensubtypen herangezogen wird.

Des Weiteren kann mittels PCR auch aus Abszess- und Biopsiematerial ein Erregernachweis durchgeführt werden. Im Falle eines ALA sollte eine Bildgebung des Oberbauches erfolgen, vorzugsweise mittels Sonografie, Computertomografie oder Magnetresonanztomografie. Bei invasiver Infektion besteht zudem die Möglichkeit des Antikörpernachweises aus dem Serum, wobei in der Regel hohe Antikörpertiter gefunden werden (Mims *et al.*, 2006; Suerbaum *et al.*, 2016).

1.1.2.5 Therapie

Die medikamentöse Therapie bei symptomatischer Amöbiasis sollte mit Nitroimidazolen erfolgen, wobei sich hierbei vor allem der Einsatz von Metronidazol und Tinidazol bewährt hat. Zur Rezidivprophylaxe sollte zudem eine Elimination luminaler Amöben mittels Paromomycin oder Diloxanidfuroat angeschlossen werden. Auch asymptomatische Träger und Ausscheider von *E. histolytica* können mit Paromomycin behandelt werden. Bei Auftreten eines ALA sollte eine chirurgische Intervention im Sinne einer Punktion und Drainage des Abszesses möglichst vermieden werden, da auch sehr große oder multilokale Abszesse generell gut auf die medikamentöse Therapie ansprechen (Gonzales *et al.*, 2019; Lubbert *et al.*, 2014; Stanley, 2003).

Ein Impfstoff liegt momentan nicht vor, es gibt allerdings einige Forschungsbemühungen auf diesem Gebiet, wovon vor allem die Untersuchungen des Oberflächenproteins Gal-lectin vielversprechende Ergebnisse in Tierversuchen hervorgebracht haben (Quach *et al.*, 2014).

1.2 Transmission und Prävention intestinaler Protozoeninfektionen

1.2.1 Transmission und Risikofaktoren

Die medikamentöse Behandlung intestinaler Protozoeninfektionen ist vergleichsweise einfach durchzuführen und auch in Ländern mit geringerer Gesundheitsversorgung verfügbar. Allerdings verhindern Reinfektionen in Hochprävalenzgebieten sowie niedrige hygienische Verhältnisse das Durchbrechen des Übertragungszyklus. Die umweltbeständigen Zysten von *E. histolytica* überleben in feuchtem Milieu bis zu mehreren Monaten und lassen sich auch durch die Chlorierung von Wasser nicht zuverlässig abtöten. Dagegen werden sie durch Trocknen, Gefrieren oder Erhitzen über 50 Grad sowie Ultraviolett-Bestrahlung zerstört (Harries, 1982). Kontaminiertes Trinkwasser und in kontaminiertem Wasser gewaschene sowie ungekochte und ungeschälte Nahrungsmittel stellen die Hauptinfektionsquellen dar. Auch sind die Übertragung durch Fliegen sowie durch Geschlechtsverkehr bekannt (Suerbaum *et al.*, 2016).

Die Verbreitung intestinaler Protozoeninfektionen ist daher stark mit dem Zugang zu sauberem Wasser, sanitären Anlagen sowie mit den allgemeinen hygienischen Bedingungen assoziiert. So wurden in einer indischen Studie die Nutzung von nicht gereinigtem Flusswasser und der Mangel an adäquaten sanitären Einrichtungen als Risikofaktoren für eine Amöbeninfektion detektiert (Nath *et al.*, 2015, e0004225).

Bezüglich *G. intestinalis* konnten in einer malaysischen Studie als Risikofaktoren für eine Infektion ebenso der Mangel an funktionsfähigen Toiletten, aber auch das Nichtabwaschen von Obst und Gemüse vor dem Verzehr, sowie das Nichtkochen des Wassers und das Nichtwaschen der Hände nach Tierkontakten und vor dem Essen beschrieben werden (Choy *et al.*, 2014). Auch erhöhen bei Haushalten ohne Zugang zu fließendem Wasser das Lagern von Wasser in Tanks, Eimern oder Kanistern das Risiko für eine Infektion (Cifuentes *et al.*, 2004). Für *G. intestinalis* wurde außerdem nachgewiesen, dass die humanpathogenen Genotypen auch Haus- und Nutztiere befallen können und

somit als Erreger von Zoonosen einen wichtigen Übertragungsweg darstellen (Feng und Xiao, 2011). Auch *E. histolytica* kann Haus- und Nutztiere befallen, was aber keinen starken Risikofaktor für eine humane Infektion darstellt (Nath *et al.*, 2015, e0004225). Außerdem ist bei den Überlegungen zu den Transmissionszyklen zu bedenken, dass sowohl Träger einer symptomatischen als auch einer asymptomatischen Infektion Zysten von *G. intestinalis* sowie *E. histolytica* ausscheiden können (Suerbaum *et al.*, 2016).

1.2.2 Prävention und WASH

Die Prävention intestinaler Protozoeninfektionen besteht hauptsächlich in der Einhaltung von Hygienemaßnahmen sowie der Bereitstellung des Zugangs zu sauberem Trinkwasser und Toiletten, zusammengefasst unter dem Akronym WASH (engl.: Water, Sanitation, Hygiene).

Zur Nahrungshygiene gehören vorwiegend der Verzehr ausschließlich gekochter oder geschälter Speisen. Zudem sollte Trinkwasser entweder speziell gefiltert oder abgekocht werden, eine Chlorierung ist nicht ausreichend (Gadgil, 1998).

Betrachtet man mögliche Verbesserungen der hygienischen Bedingungen, können schon einfachste Maßnahmen, wie das Händewaschen mit Seife, das allgemeine Risiko infektiöser Durchfallerkrankungen um 42-47 % senken (Curtis und Cairncross, 2003). Hinsichtlich der Wasserversorgung wurde beispielsweise bei einer Querschnittsstudie beschrieben, dass verbesserte und saubere Wasserspender protektive Faktoren bezüglich intestinaler Protozoeninfektionen sind. So zeigten Matthys *et al.* 2011, dass Brunnen und Standpumpen das Risiko einer Infektion mit *G. intestinalis* sowie *E. histolytica* signifikant senkten. Im Hinblick auf den Zugang zu sanitären Anlagen konnten Choy *et al.* 2014 in der oben bereits erwähnten Studie in dem Mangel an adäquaten Toiletten einen deutlichen Risikofaktor für eine Infektion mit *G. intestinalis* ausmachen. Auf der anderen Seite führen der Ausbau von Sanitäranlagen und eine Verbesserung der Wasserversorgung zu einer geringeren Infektionsrate. Diesbezüglich wurde in einer Studie auf Kome Island im Nordwesten Tansanias gezeigt, dass die

Implementierung eines Programms zur partizipativen, von der Gemeinschaft getragenen Verbesserung der Hygiene und der sanitären Bedingungen (PHAST) ein effektives Werkzeug in der Bekämpfung von Infektionskrankheiten darstellen kann (Kaatano *et al.*, 2015). Dies verdeutlicht, dass gesundheitsbildende Maßnahmen sowie Schulungen der Bevölkerung als vergleichsweise leicht durchführbare und effektive Methoden notwendig sind, um das Risiko intestinaler Protozoeninfektionen in der Bevölkerung zu senken und somit weitreichend Krankheits- und auch Todesfälle zu verhindern.

Die Dringlichkeit der Prävention von Infektionskrankheiten durch den verbesserten Zugang zu WASH zeigt nicht zuletzt dessen Deklaration als Sustainable Development Goal (SDG) Nummer sechs durch die Vereinten Nationen im Jahr 2015 (Votruba und Thornicroft, 2016).

Neben den obligat pathogenen intestinalen Protozoeninfektionen mit *G. intestinalis* und *E. histolytica* stellen auch die nicht obligat pathogenen Protozoeninfektionen wichtige Leitkeime für die Hygienestandards innerhalb einer Population dar. Zu diesen gehören neben *E. dispar* auch *Entamoeba coli*, *Iodamoeba bütschlii* und *Blastocystis hominis*. Da letzteres Protozoon von einigen Autoren mit abdominellen- und Allgemeinsymptomen in Verbindung gebracht und nicht mehr zu den apathogenen Protozoeninfektionen gezählt wird, wird hier von nicht obligat pathogenen Protozoeninfektionen gesprochen (Amin, 2002).

1.3 Eingliederung in das SchistoControl Pilotprojekt

Die Studie ist Teil des Projektes „Proof of concept study on sustainable schistosomiasis elimination through an integrated community based approach on Ijinga Island, Mwanza, northwestern Tanzania“, im Folgenden kurz als SchistoControl Pilotprojekt bezeichnet. Ziel des Projektes ist die lokale Elimination von Schistosomeninfektionen in einer Hochprävalenzregion durch einen multimodalen Ansatz. Dieser enthält neben der medikamentösen Therapie auch Gesundheitsaufklärungs- und WASH-Maßnahmen (Mueller *et al.*, 2019).

Um den Erfolg dieser WASH-Maßnahmen messen zu können, wird ein Marker benötigt, der direkt von den hygienischen Bedingungen abhängig ist und nicht durch die regelmäßige Praziquantel-Therapie beeinflusst wird. Da solche Interventionen, wie oben bereits dargestellt, die Infektionsrate intestinaler Protozoen erniedrigen (Kaatano *et al.*, 2015), vermuten wir, dass eben diese als sinnvolle Marker für die WASH Maßnahmen dienen können. Daher sollen in dieser Studie Basisdaten zu Ermittlung der Prävalenz intestinaler Protozoeninfektionen auf Ijinga Island generiert werden, sodass der Erfolg der WASH-Interventionen an einer verringerten Infektionsrate bei einer erneuten Erhebung in einigen Jahren direkt abgelesen werden kann.

1.4 Fragestellungen und Zielsetzung

1.4.1 Zusammenfassende Problemstellung

Aktuelle Prävalenzdaten von *G. intestinalis* und *E. histolytica* beziehen sich größtenteils auf Europa und Nordamerika, wo eine große Anzahl der Infektionen von Reiserückkehrern aus den Tropen und Subtropen stammen. Daten bezüglich der Prävalenz in LDCs sind, vor allem in Subsaharaafrika, rar.

Die wenigen vorhandenen Studien aus verschiedenen Regionen außerhalb Europas und Nordamerikas lassen allerdings vermuten, dass dort kein Rückgang der Prävalenz zu verzeichnen ist (Feng und Xiao, 2011; Nath *et al.*, 2015).

So sind auch nur spärlich Daten von Präventionsprogrammen sowie Anwendungen von WASH-Maßnahmen vorhanden.

Ein weiteres wesentliches Problem liegt darin begründet, dass die wenigen vorliegenden Daten mangels anderer diagnostischer Möglichkeiten größtenteils durch mikroskopische Methoden gewonnen wurden und daher nur unzureichende Informationen über die tatsächliche Verbreitung intestinaler Protozoeninfektionen geben können. Dies betrifft auch die Daten aus Tansania (Mazigo *et al.*, 2010; Speich *et al.*, 2013). Wie schon in Kapitel 1.1.2.1 erwähnt,

kann die pathogene *E. histolytica* von der apathogenen *E. dispar* nur durch eine amöbenspezifische PCR unterschieden werden. Zudem sind Daten über Komplikationen infolge von Amöbeninfektionen, vor allem von ALA, ebenfalls nur unzureichend vorhanden und entstammen vor allem dem asiatischen und latinoamerikanischen Raum. Auch die Giardiendiagnostik mittels Mikroskopie ist anspruchsvoll und untersucherabhängig. Um eine genaue und valide Prävalenz von *G. intestinalis* und vor allem von *E. histolytica* angeben zu können, werden daher molekularbiologische Nachweisverfahren benötigt (Beyhan und Tas Cengiz, 2017; Britten *et al.*, 1997).

1.4.2 Hypothesen und Fragestellungen

Aus den oben genannten Problemstellungen ergibt sich die Hauptfragestellung dieser Dissertationsarbeit:

- Wie hoch ist die tatsächliche Prävalenz von *G. intestinalis* und *E. histolytica* in einem repräsentativen Bevölkerungsquerschnitt auf Ijinga Island im Nordwesten Tansanias?

Aufgrund der Ergebnisse anderer Studien des Missionsärztlichen Instituts in verschiedenen Regionen Tansanias werden weiterhin folgende Hypothesen aufgestellt:

- Der molekularbiologische Nachweis mittels PCR wird zeigen, dass die tatsächliche Anzahl von Infektionen mit *E. histolytica* deutlich niedriger ist, als durch die Mikroskopieergebnisse angenommen.
- Der molekularbiologische Nachweis mittels PCR wird zeigen, dass die vermeintlich mit *E. histolytica* infizierten Studienteilnehmer zum größten Teil Träger der apathogenen *E. dispar* sind.

1.4.3 Zielsetzung

Die Bestimmung der Basisdaten zur Prävalenz intestinaler Protozoeninfektionen kann als Marker für WASH- und gesundheitsbildende Maßnahmen auf der Insel dienen und deren Effektivität im Sinne eines Monitoring Programmes verdeutlichen. Wenn sich bei Folgestudien dann eine wesentliche Verringerung der Prävalenz zeigt, kann von einer hohen Effektivität der WASH-Maßnahmen ausgegangen werden.

Diese Herangehensweise kann in der Folge auch auf andere Regionen übertragen werden und so eine Verbesserung der WASH-Infrastrukturen einer Population messbar machen. Somit könnte durch die Ergebnisse dieser Studie und Folgestudien der Weg zur weltweiten Verminderung intestinaler Protozoeninfektionen, aber auch einer Vielzahl weiterer Infektionen, welche durch geringe hygienische Verhältnisse begünstigt werden, geebnet werden. Hier sind vor allem im Hinblick auf den Studienort die in Tansania endemischen Infektionen mit Schistosomiasis und Soil-transmitted helminths (STH) zu nennen (Kaatano *et al.*, 2015; Mazigo *et al.*, 2012). Im Zuge von WASH-Maßnahmen und PHAST-Interventionen könnten so zahlreiche Infektionen und Todesfälle infolge von Komplikationen dieser Infektionen verhindert werden.

Der Studienort Ijinga Island in Tansania eignet sich vor allem deshalb für diese Arbeit, da die Prävalenz intestinaler Protozoeninfektionen hier bisher größtenteils unbekannt war und in der Vergangenheit keine protozoenwirksamen Massenbehandlungen (MDA) durchgeführt worden sind.

Weiterhin kann durch die Daten dieser Studie die Epidemiologie von *G. intestinalis* und *E. histolytica* besser beschrieben werden. Da als Austragungsort ein wirtschaftlich niedriger entwickeltes Land der Subsahararegion ausgewählt wurde, kann die Prävalenz in Regionen mit ähnlichen Konditionen zumindest genauer geschätzt und eingeordnet werden.

Molekularbiologische Verfahren waren zudem bisher in Tansania nicht als Standard für den Nachweis intestinaler Protozoeninfektionen etabliert. Die Arbeit könnte die Bedeutsamkeit der Implementierung dieser Methoden unterstreichen,

da sie eine bessere Differenzierung der Spezies erlauben und durch eine höhere Sensitivität gekennzeichnet sind.

Die Zielsetzung sollte durch die Untersuchung von Stuhl- und Urinproben einer zufällig ausgewählten Stichprobe von Studienteilnehmern des SchistoControl Pilotprojektes auf Ijinga Island erfüllt werden (Mueller *et al.*, 2019).

Nach intensiver Aufklärung über den Nutzen und das Risiko einer Studienteilnahme wurden von allen Teilnehmern Stuhlproben in handelsüblichen Röhrchen gesammelt. Hierbei wurden in Formaldehyd konservierte Stuhlproben nach Aufarbeitung und Konzentrierung durch die Sodium Acetic Acid Formalin (SAF) Technik lichtmikroskopisch untersucht. In Ethanol konservierte Stuhlproben wurden zudem nach Extraktion der DNA mittels real-time PCR auf *G. intestinalis* und *E. histolytica* sowie *E. dispar* untersucht.

Kato-Katz Stuhlausstriche, CCA Urintests, sowie Stuhlmikroskopie nach Anreicherung mittels der SAF Methode wurden zum Nachweis von *S. mansoni* Infektionen genutzt. Im Rahmen des SchistoControl Pilotprojektes wurden außerdem sonografische Untersuchungen der Leber durchgeführt, um den Schweregrad der durch die Schistosomiasis bedingten Leberfibrose zu klassifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 **Materialien**

2.1.1 Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Essigsäure 99-100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol 99,8 %	AppliChem, Darmstadt
Ethylacetat 98 %	Armin Baack, Schwerin
Formaldehyd 37 %	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid 0,9 %	Merck, Darmstadt
PBS	AppliChem, Darmstadt

2.1.2 Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Dispensette 1-10 ml	Brand, Wertheim
Dry Block Thermostat TDB-100	Biosan, Riga
Feinwaage Adventurer® Pro	OHAUS, Parsippany
Gefrierschrank Premium	Liebherr, Bulle
Lichtmikroskop: Olympus CX31RBSF Objektive: <ul style="list-style-type: none">• Plan Achromat C 10x, NA 0.25• Plan Achromat C 40x, NA 0.65• Plan Achromat C 100x, NA 1.25	Olympus Corporation, Tokio Olympus Corporation, Tokio

Mikroskop Kamera SC50	Olympus Corporation, Tokio
Pipetten: <ul style="list-style-type: none"> • 100-1000 µl • 10-100 µl • 0,5-10 µl 	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Qubit® 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham
StepOne™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Singapur
Vortexer Modell K-550-GE	Bender & Hobein AG, Zürich
Vortexer Modell Reamix 2789	Hecht-Assistent, Sondheim
Zentrifuge Modell Mikro 120	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Modell Spectrafuge Mini	Labnet, Woodbridge
Zentrifuge Modell Rotanta TRC	Hettich, Tuttlingen

2.1.3 Liste der Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Baumwollstäbchen	Carl Roth, Karlsruhe
Cellstar® Tubes 15 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Deckgläser 21 x 26 mm	Carl Roth, Karlsruhe
Drahtsieb Rotilabo®	Carl Roth, Karlsruhe
Einmalfilterspitzen 1000 µl	A. Hartenstein, Würzburg
Einmalfilterspitzen 100 µl	A. Hartenstein, Würzburg
Einmalfilterspitzen 10 µl	A. Hartenstein, Würzburg
Gaze: Peha-last®	Hartmann, Heidenheim
Holzspatel	Dahlhausen, Köln
Kryoröhrchen Nalgene® 2,0 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Kunststofftrichter	A. Hartenstein, Würzburg
Objektträger 76 x 26 mm	Carl Roth, Karlsruhe

Pasteur Pipette LW 4040,	Alpha Laboratories, Hampshire
PCR Reaktionsgefäße	Applied Biosystems, Waltham
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Stuhlröhrchen	Paul Böttger, Bodenmais

2.1.4 Primer und Sonden

a) Primer

Eurofins Genomics, Ebersberg

G62F: 5'-GACGGCTCAGGACAACGGTT-3'	100 pmol/µl
G62R: 5'-TTGCCAGCGGTGTCCG-3'	100 pmol/µl
Ehd-88R: 5'-GCGGACGGCTCATTATAACA-3'	100 pmol/µl
Ehd239F 5'-ATTGTCGTGGCATCCTAACTCA-3'	100 pmol/µl

Vorlagen der von Eurofins Genomics gefertigten Primer entstammen den Studien von Verweij *et al.* aus dem Jahr 2003 (Verweij *et al.*, 2003a; Verweij *et al.*, 2003b).

b) Sonden

Eurofins Genomics, Ebersberg

Giardia62P: 5'-CCCGCGGCGGTCCCTGCTAG-3'	100 pmol/µl
Ehistolytica-96_MGB: 5'-TCATTGAATGAATTGGCCATTT-3'	100 pmol/µl
Edispar-96_MGB: 5'-TACTTACATAAATTGGCCACTTTG-3'	100 pmol/µl

Auch hier entstammen die Vorlagen der von Eurofins Genomics gefertigten Sonden den Studien von Verweij *et al.* (Verweij *et al.*, 2003a; Verweij *et al.*, 2003b). Modifiziert wurden die Sonden, indem als Fluorophor am 5' Ende der Farbstoff FAM und als Dark Quencher am 3' Ende BHQ1 angehängt wurde.

2.1.5 Lösungen und Kits

a) Lösungen:

SAF Lösung (1000 ml):	15 g Natriumacetat
	20 ml Essigsäure 99-100 %
	40 ml Formaldehyd 37 %
	925 ml Aqua destilliert

b) Kits:

QIAmp® DNA Stool Mini Kit Qiagen, Hilden

QuantiFast® Pathogen PCR + IC Kit Qiagen, Hilden

- Internal Control Assay
 - Internal Control DNA template
 - Internal Control Assay (TaqMan® probe)
- High-ROX Dye Lösung
- Puffer QT (Nucleic Acid Dilution Buffer)
- Puffer TE
- QuantiFast Pathogen PCR Master Mix
 - Concentrated master mix
 - HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase
 - QuantiFast Pathogen Buffer

Das Internal Control Assay wurde nach Herstellerangaben vor Benutzung in 1,1 ml TE Buffer gelöst, die Internal Control DNA in 1,1 ml QT Buffer.

2.1.6 Positivkontrollen

<i>Entamoeba dispar</i> DNA	Bernard-Nocht-Institut, Hamburg
<i>Entamoeba histolytica</i> DNA	Bernard-Nocht-Institut, Hamburg
<i>Giardia intestinalis</i> DNA	Bernard-Nocht-Institut, Hamburg

2.1.7 Computer und Software

Computer: Dell Latitude D 520	Dell Technologies, Texas
MacBook Pro 2011	Apple Inc., San Francisco
Endnote Version X 8.2	Clarivate Analytics, Philadelphia
IBM SPSS Statistics Version 24	SPSS Inc., Chicago USA
Microsoft Office Excel 2016	Microsoft, Redmont USA
Microsoft Office Word 2016	Microsoft, Redmont USA
StepOne Software	Applied Bio Systems, Singapur
cellSens Entry 1.12	Olympus, Tokio

2.2 Patienten und Methoden

2.2.1 Studiendesign und Fallzahlberechnung

In der vorliegenden Studie wurden Stuhlproben von Teilnehmern des SchistoControl Pilotprojektes untersucht (Mueller *et al.*, 2019). Die Stuhlproben wurden im Rahmen des Projektes im September 2016 gesammelt. Aus der Gesamtzahl von 931 Stuhlproben der Studienteilnehmer wurde per Zufall eine repräsentative Bevölkerungsstichprobe aller Altersklassen sowie beider

Geschlechter ausgewählt. Somit handelt es sich um eine Querschnittsstudie zur Ermittlung der Prävalenz intestinaler Protozoeninfektionen. Ziel der Studie ist die Gewinnung von Ausgangsdaten zur Evaluierung und zum Monitoring von Hygieneaufklärungs- und Gesundheitsbildungsmaßnahmen.

Um die erforderliche Mindestteilnehmerzahl dieser Studie zu bestimmen, wurde die Stichprobengröße mit Hilfe der Leslie Kish Formel berechnet. Da die Prävalenz von *G. intestinalis* in weniger entwickelten Ländern von 8 bis 30 % beschrieben wird (Feng und Xiao, 2011) und Studien aus Regionen Tansanias für *E. histolytica*/*E. dispar* eine Prävalenz von 18,0 % und 13,6 % angeben (Mazigo *et al.*, 2010; Speich *et al.*, 2013), wird für die Fallzahlberechnung jeweils ein Mittelwert von 15 % als vermuteter Prävalenzwert eingesetzt. Somit ergibt sich folgende Formel:

$$N = \frac{p(1-p)Z^2}{d^2}$$

wobei gilt:

N = erforderliche Fallzahl

Z = Konfidenzintervall 95 %
(Standardwert: 1,96)

P = Vermutete Prävalenz 15 %

D = Standardfehler 5 %

Die so berechnete minimal benötigte Zahl der Studienteilnehmer ergibt 196.

Um Verluste, Beschädigung durch den Transport und die Nichtverwertbarkeit von Proben aufgrund mangelnder Probenmenge zu kompensieren, wurden 400 Studienteilnehmer per einfacher Zufallsstichprobe für die Studie ausgewählt.

2.2.2 Studienort

Austragungsort der Studie ist die etwa 7 km² große Insel Ijinga, welche an der Südseite des Viktoriasees auf den folgenden Koordinaten liegt: 2°30'38.23" S und 33°20'31.15" W. Die Insel liegt im Magu Distrikt im Nordwesten Tansanias,

etwa 45 km östlich der Stadt Mwanza. Nach der Datenerhebung im Zuge des SchistoControl Projektes im Februar 2016 umfasste die Bevölkerung zum Zeitpunkt der Stuhlprobenabgabe 2290 Personen in 372 Haushalten. Die Einwohner entstammen fünf verschiedenen Dörfern und leben vor allem vom Fischfang sowie von der Subsistenzlandwirtschaft, insbesondere dem Anbau von Reis, Mais und Maniok. Die Insel verfügt über eine Grundschule mit etwa 600 Schülern sowie eine Gesundheitsstation (Dispensary). Die Gemeinden sind nicht an die Stromversorgung angeschlossen und zu Projektbeginn war der Viktoriasee die einzige Trink- und Nutzwasserquelle der Bewohner. Durch den intensiven Kontakt mit dem Seewasser war von einer hohen Prävalenz an Schistosomiasis auszugehen, weshalb die Insel als Studienort des SchistoControl Pilotprojektes ausgewählt wurde. Zudem besteht eine stabile Bevölkerungssituation mit vergleichsweise geringem Migrationsverhalten. Im Anhang findet sich eine Karte der Insel. Durch den niedrigen Hygienestatus und den Mangel an Sanitäreinrichtungen ist außerdem von einer hohen Prävalenz intestinaler Protozoeninfektionen sowie Infektionen mit STH auszugehen.

2.2.3 Medikamentöse Therapie

Da in der Kalkulation des Pilotprojektes der SchistoControl Studie von einer hohen Prävalenz vor allem von Schistosomiasis, aber auch von STH ausgegangen wurde, fanden und finden mehrere medikamentöse Behandlungsrunden in festgelegten zeitlichen Abständen statt. Hinsichtlich der Infektionen mit *S. mansoni* wurden die Studienteilnehmer nach Aufklärung über Risiken und Nebenwirkungen in mehrmonatigem Abstand zyklisch mit Praziquantel (40 mg pro Kilogramm Körpergewicht) behandelt.

Da die Untersuchung der Stuhlproben hinsichtlich der Protozoeninfektionen mit *G. intestinalis* sowie *E. dispar* und *E. histolytica* erst zwei Jahre nach der Probenentnahme erfolgte, ergab sich daher auch für positiv getestete Studienteilnehmer aufgrund der zeitlichen Latenz keine Indikation für eine

medikamentöse Behandlung. Zum einen sind in Hochprävalenzgebieten asymptomatische Infektionen mit *G. intestinalis* häufig und symptomatische Infektionen in der Regel selbstlimitierend. Zum anderen erfordern Infektionen mit *E. dispar* generell keine Behandlung, da dieses Protozoon als apathogen gilt (Clark, 1998). Zudem ist anzunehmen, dass Studienteilnehmer im Falle einer symptomatischen *E. histolytica* Infektion zeitnah medizinische Hilfe aufgesucht haben und empirisch gemäß nationaler Empfehlungen behandelt wurden. Im Rahmen des SchistoControl Projektes wurde seit Projektbeginn der kontinuierliche Aufbau einer medizinischen Infrastruktur unterstützt.

2.2.4 Studienpopulation

An der Studie teilgenommen haben Kinder ab sechs Monaten sowie Erwachsene aller Altersgruppen und beider Geschlechter, welche die folgenden Einschlusskriterien erfüllten:

Teilnehmer wurden in die Studie eingeschlossen, wenn

- I. sie ständige Bewohner von Ijinga Island waren (wohnhaft in Ijinga Island seit mehr als zwei Jahren). Kinder unter zwei Jahren wurden als ständige Bewohner angesehen, wenn sie seit ihrer Geburt auf der Insel gelebt haben.
- II. sie sich als Migranten seit mindestens drei Monaten auf Ijinga niedergelassen hatten, um der Fischerei nachzugehen.
- III. sie durch Unterschrift oder Zeichen der schriftlichen Einverständniserklärung in die Studienbedingungen eingewilligt haben. Für Kinder und minderjährige Jugendliche wurde die Einverständniserklärung von Eltern oder gesetzlichem Betreuer eingeholt.

2.2.5 Gewinnung der Stuhlproben

Zur Gewinnung der Stuhlproben wurde 2016 im Rahmen des SchistoControl Projektes den Studienteilnehmern nach Erklärung durch geschultes Studienpersonal ein handelsübliches 12 ml fassendes Stuhlröhrchen mit nach Hause gegeben, welches die Studienteilnehmer mit Stuhl befüllt wieder abgaben. Aus jeder Stuhlprobe wurde nachfolgend ein Teil des Stuhls für die PCR Untersuchung in ein Kryoröhrchen überführt und Ethanol 90% zur Konservierung hinzugefügt. Außerdem wurde eine etwa 50 mg fassende Portion der Originalprobe für die Untersuchung des Stuhlausstrichs nach Kato-Katz entnommen. Der verbleibende Stuhl wurde mit Formaldehyd 4 % versetzt, bis das Stuhlröhrchen komplett gefüllt war.

Aus den insgesamt 931 gesammelten Proben wurden mittels repräsentativer Zufallsstichprobe durch die SPSS Software 400 Studienteilnehmer ausgewählt, deren Proben lichtmikroskopisch und molekularbiologisch untersucht werden sollten. Nach Aussortieren der Proben mit ungenügendem Inhalt für die Laboruntersuchungen blieb ein tatsächliches Kollektiv von 357 Studienteilnehmern übrig.

2.2.6 Kato-Katz Präparate

Die Kato-Katz Technik ist eine spezielle Vorgehensweise zur Anfertigung von Stuhlausstrichpräparaten, welche anschließend mikroskopisch untersucht werden und Aufschluss über die Quantität einer Infektion mit *S. mansoni* geben können. Zudem können in der Mikroskopie auch andere Helminthenlarven und -eier detektiert werden. Einzig Hakenwurmeier sind sehr instabil und sollten daher innerhalb von 30-60 Minuten nach Herstellung des Präparates beurteilt werden (WHO, 2008).

Die Methode wurde von Kan Kato 1954 für parasitologische Feldstudien entwickelt und von Naftale Katz 1972 optimiert (Katz *et al.*, 1972). Durch die wenig zeitintensive und einfache Durchführbarkeit wird die Kato-Katz Technik

seit vielen Jahren als bevorzugte Methode in der Schistosomiasis-Diagnostik genutzt. Zudem lassen sich durch die Anzahl der detektierten Eier (Egg count) im Ausstrich Rückschlüsse auf den Schweregrad der Infektion ziehen. Hierbei kann der Grad der Infektion in leicht (1-199 Eier pro Gramm Stuhl = epg), mittel (200-399 epg) und schwer (>399 epg) unterteilt werden (Barenbold *et al.*, 2017).

Procedere:

Eine kleine Portion der zu untersuchenden Stuhlprobe wird auf eine Unterlage, zum Beispiel eine Pappe, gegeben. Anschließend wird die Portion durch ein feinmaschiges Drahtsieb gepresst, wodurch gröbere Stuhlanteile herausgetrennt werden. Der gesiebte Stuhlanteil wird nun in das 6 mm breite Loch einer vorgefertigten Lochplatte überführt. Nach Abtragung des Überstandes wird nun diese definierte Menge Stuhl auf einen Objektträger gegeben. Anschließend wird eine dünne Cellulosehydrat-Folie, welche zuvor in eine Glycerol-Methylenblaulösung oder Glycerol-Malachitgrünlösung eingelegt war, auf die Stuhlportion aufgelegt und die Probe dann mit einem saugfähigen Papier unter Pressen ausgestrichen. Das fertige Präparat kann dann unter dem Lichtmikroskop in 100 bis 400-facher Vergrößerung untersucht werden (Barbosa *et al.*, 2017; WHO, 1994). Nach standardisierten Richtlinien wurden Schistosomiasis- und Helmintheneier gezählt und schriftlich erfasst. In der vorliegenden Arbeit wurden nach Empfehlung der WHO pro Patient zwei Präparate hergestellt und von zwei verschiedenen, erfahrenen Laboranten untersucht.

2.2.7 CCA Schnelltest

Eine weitere Methode in der Schistosomiasis-Diagnostik ist der Nachweis von zirkulierenden Antigenen durch den CCA *Point of Care* (POC) Schnelltest. CCA steht dabei für Circulating Cathodic Antigen, ein Oberflächenprotein, welches von den adulten Würmern im menschlichen Körper freigesetzt wird und im Blut oder Urin gemessen werden kann (van Dam *et al.*, 2004). In der Studie wurde der CCA-Schnelltest im Kassettenformat der Firma Rapid Medical Diagnostics aus

Pretoria verwendet. Das Testprinzip setzt sich aus einer zweimaligen monoklonalen Antikörperbindung zusammen, nach 20 Minuten ist das Testergebnis anhand einer farbigen Bande abzulesen.

Testdurchführung nach Angaben des Herstellers:

Ein Tropfen Urin und ein Tropfen der im Kit enthaltenen Pufferlösung werden auf die dafür vorgesehene Fläche der Testkassette gegeben. Nach 20 Minuten kann das Ergebnis direkt abgelesen werden. Positive Testergebnisse zeigen zwei rosa gefärbte Banden, wovon eine der Kontrollbande, die andere dem CCA Nachweis entspricht.

Der Schnelltest kann nach Herstellerangaben ebenso zur Diagnostik von mittleren bis schweren Infektionen mit *S. haematobium* herangezogen werden. Die Sensitivität ist jedoch höher für *Schistosoma mansoni*.

2.2.8 Aufbereitung der Stuhlproben mittels SAF Technik

Die in Formaldehyd konservierten Stuhlproben wurden für die lichtmikroskopische Untersuchung mittels SAF (sodium acetate acetic acid formalin) Technik aufbereitet und konzentriert. Hierzu wurde nach Herstellung der SAF Lösung (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.1.5) zunächst jeweils ein haselnussgroßes Stück Stuhl in ein Sedimentationsröhrchen überführt. Anschließend wurden 10 ml SAF Fixierlösung hinzugegeben und mit einem Holzspatel homogenisiert. Da die Stuhlprobe schon vorher in Formaldehydlösung gelagert war, entfällt die normalerweise benötigte einstündige Ruhezeit zur Fixierung. Anschließend wurde die Lösung durch ein mit Gaze bedecktes Drahtsieb in ein Sedimentationsröhrchen filtriert und bei Raumtemperatur und 2000 Upm eine Minute zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgekippt und das Sediment mit 10 ml 0,9% Natriumchloridlösung aufgeschwemmt, gevortext und geschüttelt. Hierzu wurden im Folgenden 3 ml Ethylacetat 98% hinzugegeben und nach Mischen fünf Minuten bei 2000 Upm und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment anschließend lichtmikroskopisch untersucht.

2.2.9 Lichtmikroskopie

Zur lichtmikroskopischen Untersuchung wurde jeweils ein Tropfen des nach SAF Technik aufbereiteten Sediments mittels einer Pasteurpipette auf einen Objektträger (76x26 mm) gegeben. Hierauf wurde dann ein Deckgläschen der Größe 21x26 mm platziert, welches mäanderförmig in der 100- und 400-fachen Vergrößerung auf Protozoen, sowie Eier und Larven von Helminthen durchsucht wurde. Jede Probe wurde insgesamt 20 Minuten mikroskopiert.

2.2.10 DNA-Extraktion aus den Stuhlproben

200 mg des Ethanol-konservierten Stuhls wurde in 2 ml fassende Reaktionsgefäße (Safe-Lock Tubes, Eppendorf) überführt. Anschließend wurde jede Stuhlprobe einer dreimaligen Waschprozedur mittels PBS unterzogen, um sie von Ethanol zu befreien, welches sonst die DNA-Extraktion behindern würde. Hierbei wurden jeweils 1 ml PBS zur Stuhlprobe in das Reaktionsgefäß pipettiert, anschließend mittels Vortexer durchgemischt und bei 10.000 Upm eine Minute lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde dann vorsichtig abpipettiert und verworfen. Dieser Waschschrift wurde dann noch zweimal wiederholt, sodass am Ende insgesamt dreimal PBS hinzu- und wieder abpipettiert wurde. Die DNA-Extraktion ist im Folgenden nach dem Protokoll „Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection“ mit dem QIAamp DNA Stool Mini Kit durchgeführt worden. Alle verwendeten Puffer und Lösungen waren im Kit enthalten. Die DNA-Fragmente wurden im letzten Schritt aus den Säulen gelöst, in 200 µl AE Puffer überführt und anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäßen verschlossen bei -28 Grad im Gefrierschrank gelagert.

2.2.11 PCR und Real-Time PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine molekularbiologische Methode, um DNA-Sequenzen zu vervielfältigen.

Das Prinzip besteht in der Auftrennung des DNA Doppelstrangs der zu amplifizierenden Sequenz in seine beiden Einzelstränge, an welchen dann jeweils ein neuer komplementärer Strang synthetisiert wird, wodurch die Ursprungssequenz (Matrize) verdoppelt wird.

Ein Zyklus verläuft in drei Schritten:

- I. Denaturierung: Durch Erhitzen des Reaktionsgemisches auf 95°C kommt es zum Verlust der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren und somit zur Auftrennung des Doppelstranges in seine beiden Einzelstränge.
- II. Primerhybridisierung: Durch schnelles Abkühlen des Reaktionsgemisches auf 48-60°C (je nach Primer), können sich die Primer an die jeweils komplementären Enden der Einzelstränge durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken anlagern.
- III. Elongation: Nach Adjustierung der Temperatur an die spezifische DNA-Polymeraseaktivität (meist 72°C) bindet diese nun an das 3' OH Ende des Primerkomplexes und synthetisiert mit Hilfe der im Master Mix enthaltenen Desoxyribonukleosidtriphosphate in 5' Richtung den komplementären Strang.

Für die PCR wird eine spezielle hitzestabile DNA-Polymerase benötigt. Die in dieser Arbeit verwendete HotStarTaq *Plus* DNA-Polymerase ist eine veränderte Form der rekombinanten 94 kDa DNA-Polymerase, welche ursprünglich aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* gewonnen und auf *Escherichia coli* übertragen wurde. Die HotStarTaq *Plus* DNA-Polymerase muss durch einen fünfminütigen Erhitzungsschritt vor Beginn des Zyklus aktiviert werden.

Das Aneinanderreihen vieler solcher Reaktionszyklen ermöglicht eine exponentielle Amplifikation der DNA-Sequenz und somit die Herstellung einer großen Anzahl an identischen Kopien des Ausgangsfragmentes in kürzester Zeit. Die Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz richtet sich nach der Sequenz der Primer, welche als spezifische Oligonukleotide den Startpunkt der Replikation bestimmen (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988).

In dieser Arbeit wurde ein PCR-Kit verwendet, bei welchem Primerhybridisierung und Elongation in einer einzigen Temperaturstufe stattfinden, da die DNA-Polymerase ebenfalls bei 60°C an den Primerkomplex bindet und den Gegenstrang synthetisiert. Dementsprechend läuft der PCR Zyklus in nur zwei Schritten ab, was auch als 2-Step System bezeichnet wird.

Bei der Real-Time PCR (qPCR) werden die DNA-Sequenzen zusätzlich durch Gensonden markiert, wodurch mittels eines Fluoreszenzanalysators der Ablauf der Amplifikation in Echtzeit detektiert werden kann und eine Quantifizierung des PCR-Produkts ermöglicht wird (Heid *et al.*, 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurden hierzu Hydrolyse Sonden (*TaqMan*® Sonden) verwendet. Diese Oligonukleotide sind am 5' Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff sowie am 3' Ende mit einem Quencherfarbstoff markiert und lagern sich sequenzspezifisch an die zu amplifizierende DNA an. Durch die 5'-3' Exonuklease Aktivität der DNA-Polymerase wird die Sonde während der Synthese des Gegenstranges hydrolysiert und abgebaut. Durch die daraus resultierende Trennung von Reporter und Quencher steigt die Fluoreszenz des Reporters an und markiert somit die abgelaufene Vervielfältigung der DNA-Sequenz (Holland *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1993).

Grundlage hierfür ist das Prinzip des Förster Resonanzenergietransfers (FRET), bei dem Energie eines angeregten Farbstoffs strahlungsfrei an einen zweiten Farbstoff abgegeben wird (Förster, 1948).

Somit gibt der Reporter der intakten Sonde, wenn er durch eine Lichtquelle angeregt wird, als Donor einen Teil der Energie an den am 3' Ende der Sonde

befindlichen Akzeptor (Quencher) ab und die Fluoreszenz wird unterdrückt. Entfernen sich nun durch die Hydrolyse Reporter und Quencher voneinander, nimmt der FRET ab und das Fluoreszenzsignal des Reporters mit jedem Zyklus zu. Zusammenfassend wird somit der Sondenabbau durch die DNA-Polymerase über das Fluoreszenzsignal detektiert. Dieses wird durch einen Fluoreszenzanalysator erfasst und ermöglicht so durch die Messung der Signalstärke eine Quantifizierung der DNA-Vervielfältigung (Livak *et al.*, 1995).

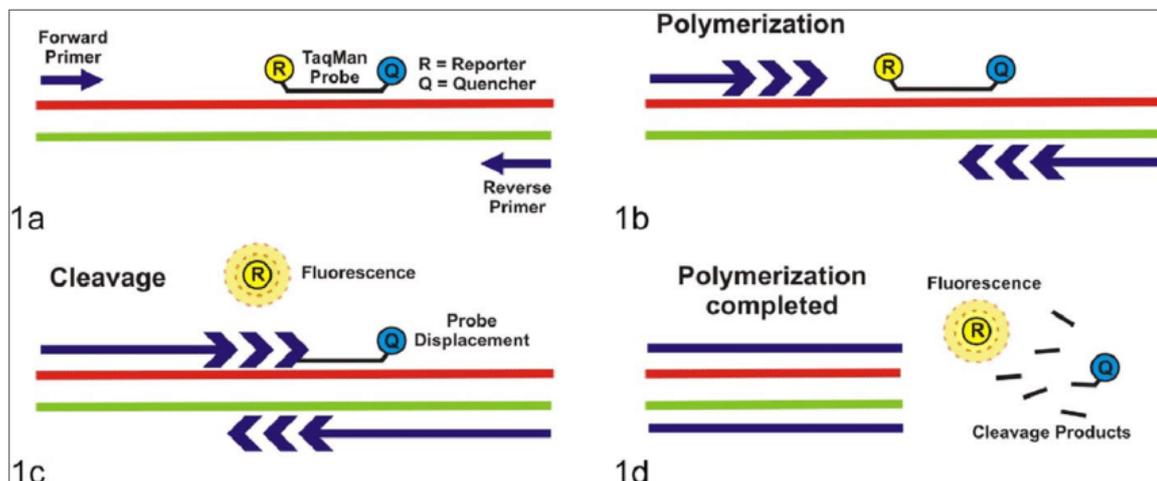


Abb. 1: Ablauf einer qPCR mit TaqMan® Sonden (Maes *et al.*, 2014)

(Nicht gewerbliche Nutzung der Abbildung durch SAGE Journals genehmigt)

Den Beginn des exponentiellen Anstiegs der Amplifikation kennzeichnet der Ct (Cycle Threshold) Wert. Dieser bezeichnet den Zyklus, an dem die Fluoreszenz des Reporters erstmals über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Ein Überschreiten dieses Schwellenwertes innerhalb von 38 Zyklen kennzeichnet ein positives Testergebnis ($Ct < 38$).

Nach Empfehlungen des Herstellers wurde nach einer PCR-Optimierung für jede Probe folgender Ansatz in handelsübliche PCR-Reaktionsgefäße pipettiert:

- 2,5 µl pathogenspezifischer Primer-Probe Mix bestehend aus:
 - 0,125 µl Primer R
 - 0,125 µl Primer F
 - 0,075 µl Probe (Fluoreszenzmarkierte Gensonde)
 - 2,175 µl nukleasefreies H₂O
 - 9,5 µl nukleasefreies H₂O
 - 2,5 µl Internal Control Assay
 - 5,0 µl Pathogen Master Mix
 - 2,5 µl Internal Control DNA
 - 0,5 µl High Dye Rox Lösung
 - + 2,5 µl Template der zu untersuchenden Probe
-
- 25 µl Gesamtvolumen

Zudem wurden ebenfalls nach Angaben des Herstellers pro Durchlauf zwei externe und zwei interne Kontrollen, welche kein Pathogen Template enthalten, hergestellt. Das im Kit enthaltene Internal Control Assay setzt sich bereits aus vom Hersteller standardisierten Primern und TaqMan® Sonden zusammen, welche spezifisch an die Internal Control DNA binden, sodass bei einem positiven Ergebnis die Kontrolle der Amplifikation erfolgt und eine mögliche PCR Inhibierung ausgeschlossen werden kann (Ct < 33). Externe Kontrollen enthalten weder die interne Kontroll-DNA noch ein Proben Template. Eine Amplifikation sollte somit nicht stattfinden und Kontaminationen können ausgeschlossen werden (Ct = 0). Somit können negative Testergebnisse korrekt interpretiert werden. Nach dem Handbuch wurden die Kontrollen folgendermaßen pipettiert:

Externe Kontrollen:

- 2,5 µl Primer-Probe Mix (Zusammensetzung siehe oben)
- 9,5 µl nukleasefreies H₂O
- 5,0 µl Pathogen Master Mix
- 2,5 µl Internal Control Assay
- 0,5 µl High Dye Rox
- + 5 µl nukleasefreies H₂O

25 µl Gesamtvolumen

Interne Kontrollen:

- 2,5 µl Primer-Probe Mix (Zusammensetzung siehe oben)
- 9,5 µl nukleasefreies H₂O
- 5,0 µl Pathogen Master Mix
- 2,5 µl Internal Control Assay
- 2,5 µl Internal Control DNA
- 0,5 µl High Dye Rox
- + 2,5 µl nukleasefreies H₂O

25 µl Gesamtvolumen

Als Positivkontrollen wurde jeweils DNA von *E. histolytica*, *E. dispar* und *G. intestinalis* verwendet.

Der Thermocycler wurde wie folgt programmiert:

- 95 Grad Celsius: 5 Minuten - Aktivierung der HotStarTaq *Plus* DNA-Polymerase

2-step cycling:

- 95 Grad Celsius: 15 Sekunden
 - 60 Grad Celsius: 30 Sekunden
- } 40 Zyklen

- 60 Grad Celsius: 5 Minuten - Post-PCR Auskühlungsphase

(Qiagen, 2011)

2.2.12 Statistik

Tabellen und Grafiken wurden mit Hilfe von Microsoft Office Word 2016 erstellt. Für die statistische Auswertung wurde SPSS für Windows Version 25 genutzt.

Die Prävalenzwerte werden mit 95 prozentigen Konfidenzintervallen angegeben. Für deren Berechnung wurde der Standardfehler der Stichprobenstatistik mit Hilfe folgender Formel geschätzt: $\sigma_p = \sqrt{[p (1-p)/ n]}$. Für einen 95-prozentigen Sicherheitsgrad der Schätzung erhält man zudem aus der Tabelle für die Standardnormalverteilung für $Z = 1,96$. Somit wurden die 95-prozentigen Konfidenzintervalle mit folgender Formel berechnet:

$$KI (95\%) = P \pm Z \times \sqrt{[p (1-p)/ n]}.$$

Der p-Wert für die statistische Signifikanz wurde auf $< 0,05$ festgelegt. Statistisch signifikante Unterschiede beim Vergleich von Häufigkeiten wurden anschließend durch den Chi-Quadrat Test sowie durch den T-Test ermittelt, für normalverteilte Werte wurden parametrische Tests verwendet. Häufigkeitsverteilung dichotomer Variablen wurden durch den Binomialtest überprüft.

Mit Hilfe von Kreuztabellen wurde außerdem die relative Häufigkeit der Einflussfaktoren auf intestinale Protozoeninfektionen untersucht und ebenfalls mittels Chi-Quadrat Test auf Unabhängigkeit überprüft. Bei Vorliegen von dichotomen Variablen wurde der Einfluss von unabhängigen Einflussgrößen auf die Prävalenzdaten mit Hilfe eines univariaten logistischen Regressionsmodells berechnet. Um die Relation zwischen den diagnostischen Tests zu quantifizieren, wurde die qPCR als Referenztest verwendet.

2.2.13 Ethische Richtlinien

Für die Untersuchung der intestinalen Protozoeninfektionen wurde ein Addendum zu dem von der Catholic University of Health and Allied Sciences (CUHAS) und des Bugando Medical Centers in Mwanza geprüften und bestätigten Ethikantrag des SchistoControl Pilotprojektes eingereicht.

Das Aktenzeichen der ethischen Prüfung der CUHAS lautet: CREC/112/2016.

Die Studie wurde des Weiteren nach den Vereinbarungen der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes zu „Ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen“ (Helsinki, 1964) durchgeführt.

Wie im Gesamtproposal des SchistoControl Pilotprojektes beschrieben, besuchten die Studienkoordinatoren vor Beginn der Studie die Gemeinden und trafen die Ortsvorsteher, um zunächst ihnen den Ablauf und die Zielsetzung der Studie zu erklären. Die Ortsvorsteher hielten im Folgenden Versammlungen in den jeweiligen Gemeinden ab, um die Dorfbewohner eingehend über die zu untersuchenden Erkrankungen, Maßnahmen, Probenabgabe sowie über Vorteile und Risiken der Teilnahme an der Studie zu informieren. Erst nach eingehender Aufklärung und Information konnten die Inselbewohner der Teilnahme an der Studie schriftlich mittels Unterschrift oder Zeichen zustimmen. Jegliche Untersuchungen, Befragungen oder sonstigen Maßnahmen fanden nach der schriftlichen Einwilligung statt. Die Teilnahme war jederzeit freiwillig und kostenfrei für die Teilnehmer. Für jeden Teilnehmer bestand zu jedem Zeitpunkt die Möglichkeit, ohne Angabe von Gründen die Zustimmung zur Studie zurückzuziehen und aus der Studie auszuschneiden. Alle Maßnahmen, einschließlich das Sammeln, Bearbeiten und Untersuchen der verschiedenen Proben sind durch qualifiziertes, geschultes und erfahrenes Personal durchgeführt worden. Zudem wurden alle Teilnehmer der Studie im Rahmen der MDAs adäquat medikamentös behandelt. Bei Infektionen mit intestinalen Protozoen waren aufgrund der zeitlichen Latenz der Untersuchungen keine medikamentösen Behandlungen indiziert (siehe Kapitel 2.2.3).

3 Ergebnisse

3.1 Studienpopulation (Teilnehmer)

3.1.1 Charakterisierung der Studienteilnehmer

Die Gesamtpopulation der Insel Ijinga bestand aus 2290 Einwohnern, die zum Zeitpunkt der Studiendurchführung in 5 verschiedenen Dörfern lebten. Nach Anwendung der in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Einschlusskriterien und der Fallzahlberechnung für das SchistoControl Pilotprojekt bildete sich ein Gesamtkollektiv aus 931 Studienteilnehmern, von denen jeweils Stuhl- und Urinproben gesammelt wurden. Die Fallzahlberechnung für das Pilotprojekt sah 384 Erwachsene und 138 Kinder und Jugendliche vor. Aus jeder Gruppe sollten für das Projekt mindestens 400 Personen eingeschlossen werden. Per Zufall wurde aus diesem Gesamtkollektiv von 931 Studienteilnehmern eine repräsentative Bevölkerungsstichprobe von 400 Teilnehmern für die vorliegende Arbeit ausgewählt. Einige Proben erwiesen sich durch transportbedingte Schäden, Beschädigungen der Identifikationsnummern sowie durch ungenügenden Probeninhalt als unbrauchbar für die Laboruntersuchungen. So ergaben sich 357 Proben, welche hinsichtlich intestinaler Protozoeninfektionen (IPI) analysiert werden konnten. Zur besseren Übersicht wird dies im Folgenden als Flussdiagramm dargestellt.

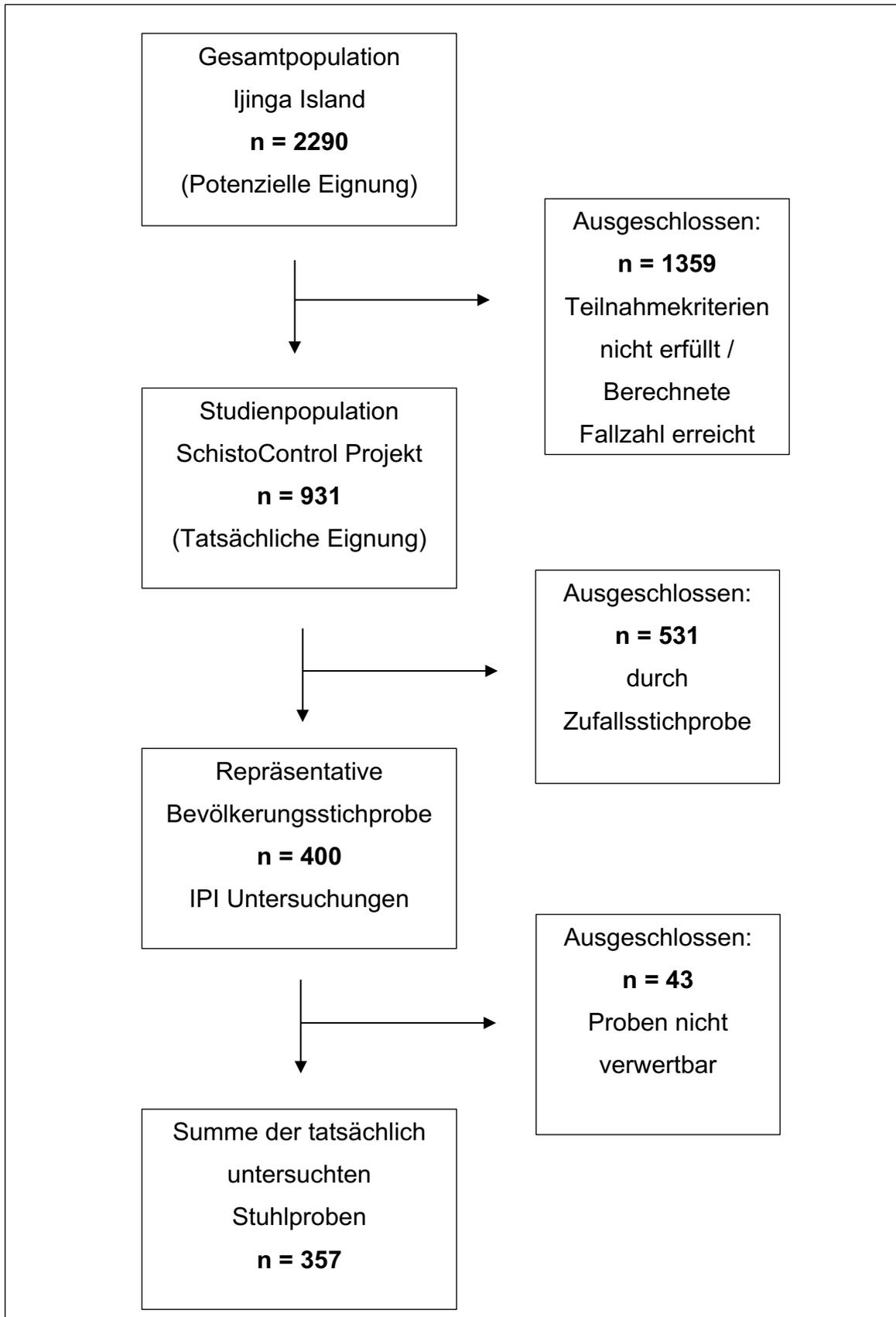


Abb. 2: Flussdiagramm zur Identifizierung der Teilnehmer (Quelle: eigene)

3.1.2 Demografische Basisdaten und deskriptive Analyse der Studienpopulation

Das Studienkollektiv setzte sich aus 52,4 % weiblichen und 47,6 % männlichen Studienteilnehmern zusammen. Wie aus Tabelle 1 und Abbildung 2 ersichtlich wird, war auch innerhalb der meisten Altersgruppen die Geschlechterverteilung ausgeglichen. In den Altersgruppen 31-40, 41-50 und 51-60 Jahre ist ein größerer Frauenanteil zu beobachten. Im Binomialtest (exakter Binomialtest, zweiseitig, Signifikanzniveau $\alpha = 0.05$,) war nur die Anzahl der Frauen in der Gruppe der 41-50 Jährigen signifikant höher gegenüber dem Prozentsatz aller Frauen der Studienbevölkerung ($p \leq 0,05$). Der Altersmedian der Gesamtpopulation lag bei 14 Jahren. Der Altersmedian in der Gruppe der weiblichen Studienteilnehmer lag bei 15 Jahren, bei Männern lag er bei 13 Jahren. Der jüngste Studienteilnehmer war 1 Jahr, der älteste 85 Jahre alt. Der Mittelwert des Alters lag bei 23,09 Jahren mit einer Standardabweichung von 18,536. Der überwiegende Anteil der Teilnehmer war 11-15 Jahre alt (23,5%). Über die Hälfte der Studienteilnehmer (53,8%) waren zum Zeitpunkt der Durchführung der Studie jünger als 16 Jahre.

Tabelle 1: Alters- und Geschlechterverteilung in der Studienpopulation

Altersgruppen (Jahre)	Gesamtzahl n (%)	Frauen n (%)	Männer n (%)	p-Wert % ♀
0-5	27 (7,6)	14 (51,9)	13 (48,1)	0,57
6-10	81 (22,7)	44 (54,3)	37 (45,7)	0,15
11-15	84 (23,5)	35 (42,7)	47 (57,3)	0,2
16-20	21 (5,9)	11 (52,4)	10 (47,6)	0,57
21-30	44 (12,3)	20 (45,5)	24 (54,5)	0,42
31-40	27 (7,6)	17 (65,3)	9 (34,6)	0,12
41-50	38 (10,6)	24 (63,2)	14 (36,8)	0,04
51-60	14 (3,9)	10 (71,4)	4 (28,6)	0,12
> 60	21 (5,9)	10 (50,0)	10 (50,0)	0,52
Gesamt	357	185 (52,4)	168 (47,6)	

p-Wert: Binomialtest, Verhältnis des prozentualen Anteils der Frauen in der jeweiligen Altersgruppe zum prozentualen Anteil aller Frauen in der Studienpopulation. Für vier Studienteilnehmer wurde kein Geschlecht protokolliert, weswegen für die Gesamtanzahl der Frauen und Männer gemeinsam n = 353 gilt.

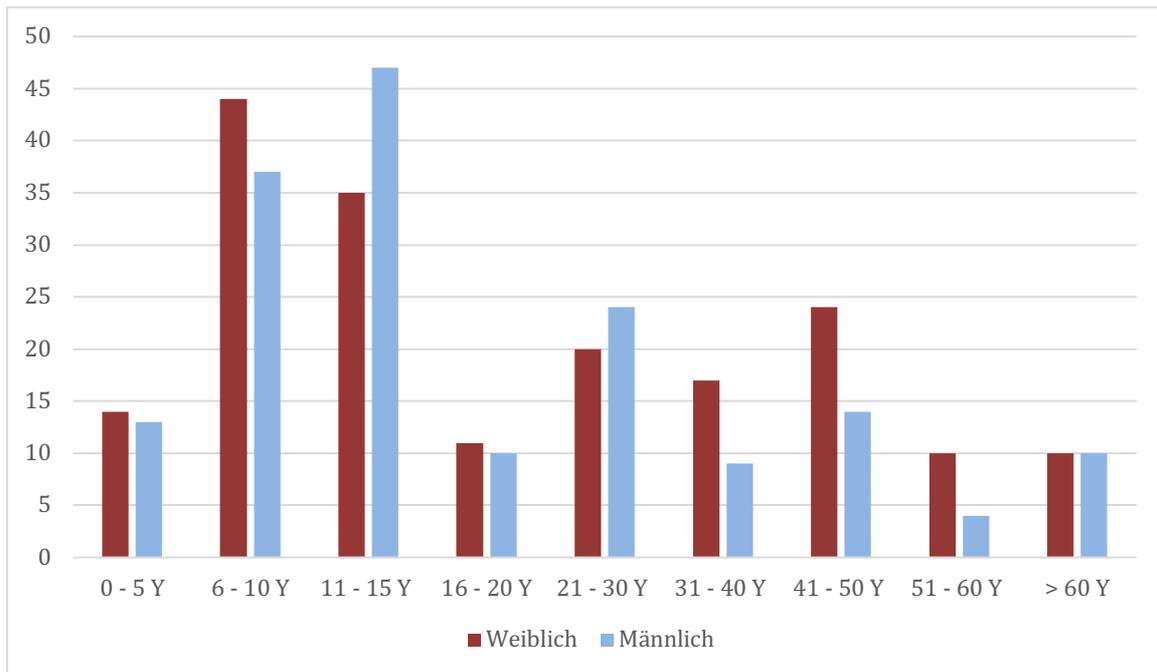


Abb. 3: Grafische Darstellung der Altersverteilung von Männern und Frauen in der Studienpopulation (Quelle: eigene)

3.2 Prävalenzdaten

3.2.1 Prävalenz *G. intestinalis*, *E. histolytica* und *E. dispar*

In der lichtmikroskopischen Untersuchung konnten in 43 Proben (12,0 %) Zysten von *G. intestinalis* gefunden werden, diese waren daher positiv. 315 (88,0 %) Proben waren negativ. Im Hinblick auf die lichtmikroskopisch nicht voneinander differenzierbaren *E. histolytica* und *E. dispar* Infektionen waren 93 Proben (26,1 %) positiv und 264 (73,9 %) negativ.

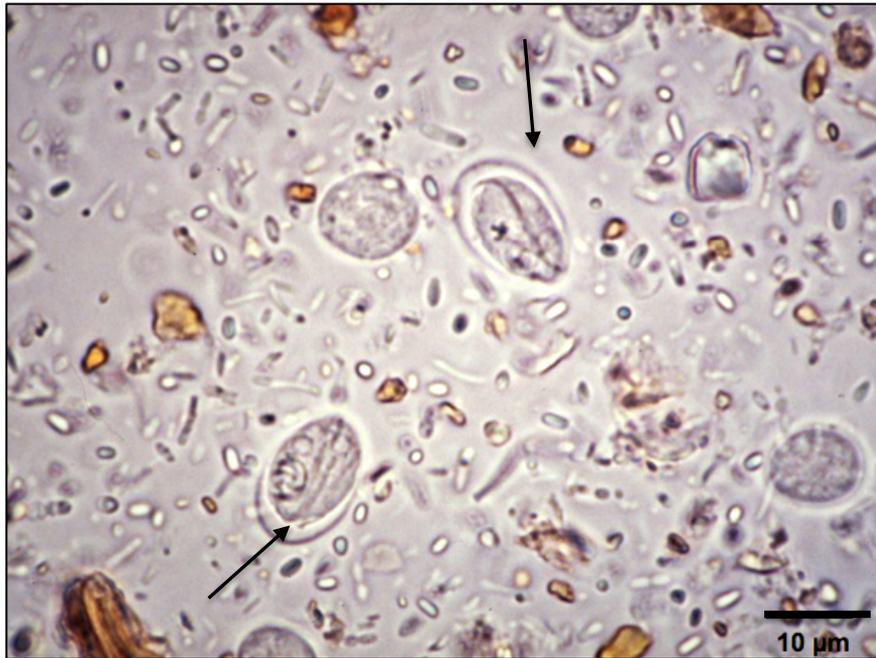
Tabelle 2: Lichtmikroskopisch ermittelte Prävalenz von *G. intestinalis* und *E. dispar/histolytica* mit 95 % Konfidenzintervallen (n Gesamt = 357)

Protozoon	Anzahl Positive (n)	Prävalenz in % (95% KI)
<i>G. intestinalis</i>	43	12,0 (8,63-15,37)
<i>E. histolytica/dispar</i>	93	26,1 (21,55-30,65)



Quelle: Missionsärztliches Institut Würzburg
(mit freundlicher Genehmigung durch Dr. med. Andreas Müller)

Abb. 4: *E. histolytica/dispar* unter dem Lichtmikroskop in 400-facher Vergrößerung. Erkennbar als runde Zysten mit deutlichem Nucleus. Eine genaue Speziesdifferenzierung mittels Mikroskopie ist nicht möglich.



Quelle: Dr. Andreas Müller, Klinikum Würzburg Mitte

(mit freundlicher Genehmigung durch Dr. med. Andreas Müller)

Abb. 5: Ellipsoide Zysten von *G. intestinalis* unter dem Lichtmikroskop in 400-facher Vergrößerung. Gut erkennbar durch den medialen Achsenstab und die Nuclei.

In der PCR Untersuchung waren 54 (15,1 %) Proben positiv für *G. intestinalis* sowie 303 (84,9 %) Proben negativ. Hinsichtlich einer Infektion mit *E. dispar* waren 78 Proben (21,8 %) positiv und 279 (78,2 %) negativ. In der PCR Untersuchung auf Infektionen mit *E. histolytica* fand sich keine positive Probe. Die molekularbiologisch detektierte Prävalenz für *G. intestinalis* lag somit bei 15,1 % (95 % KI 11,4-18,8 %) und bei 21,8 % (95% KI 17,5-26,1%) für *E. dispar* sowie bei 0 für *E. histolytica*.

Tabelle 3: Durch Anwendung der qPCR ermittelte Prävalenz von *G. intestinalis* und *E. dispar* sowie *E. histolytica* mit 95 % Konfidenzintervallen (n Gesamt = 357)

Protozoon	Anzahl Positive (n)	Prävalenz in % (95% KI)
<i>G. intestinalis</i>	54	15,1 (11,4-18,8)
<i>E. dispar</i>	78	21,8 (17,5-26,1)
<i>E. histolytica</i>	0	0

Im Folgenden wird eine Aufzeichnung des Amplifikationsverlaufes der *G. intestinalis* Testung in der qPCR beispielhaft für die untersuchten Pathogene dargestellt. Auf den Achsen ist die Anzahl der Zyklen (Ct Wert) linear gegen das Fluoreszenzsignal der amplifizierten Fragmente (ΔRn) aufgezeichnet. Die Amplifikationskurven der verschiedenfarbigen positiven Ergebnisse zeigen einen typischen exponentiellen Anstieg. Der Schwellenwert lag bei 0,2 ΔRn . Ein Anstieg über den Schwellenwert kennzeichnet einen Anstieg der Fluoreszenz der Probe über die Hintergrundfluoreszenz. Eine Probe wurde als positiv deklariert, wenn ein Anstieg über den Schwellenwert vor Ct = 38 erfolgte. Negativkontrollen sind durch einen linearen Verlauf entlang der Nulllinie gekennzeichnet.

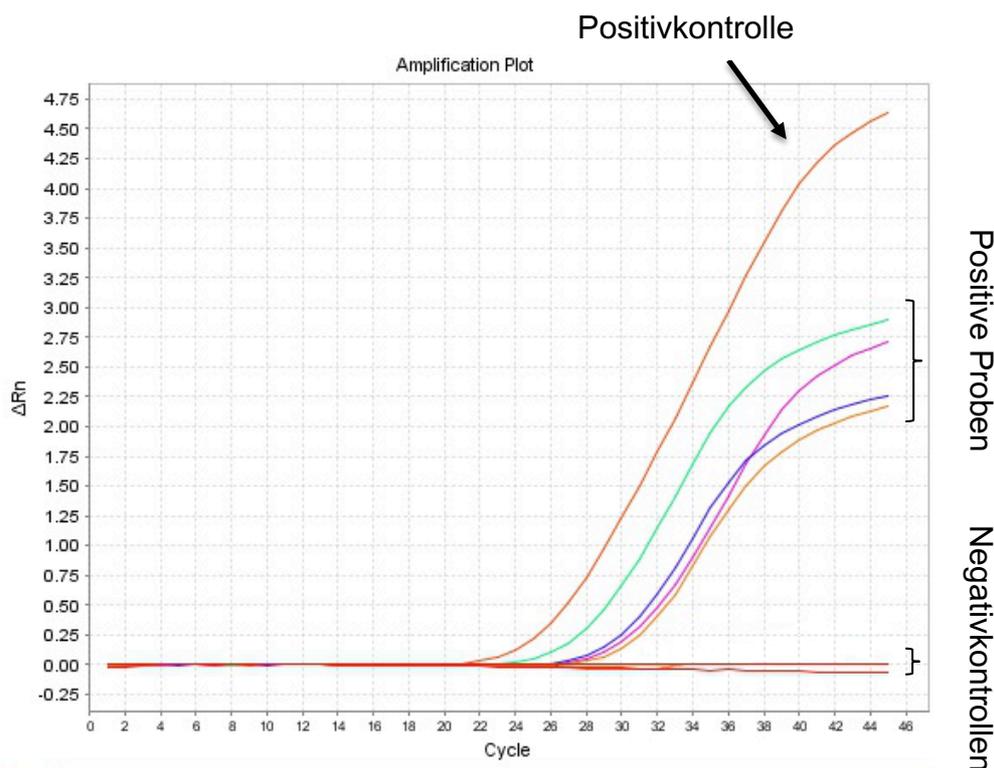


Abb. 6: PCR Testung auf *G. intestinalis*. Der höchste Anstieg bei Ct = 22 kennzeichnet die Positivkontrolle. Zudem sind vier weitere deutliche Anstiege über den Schwellenwert zu erkennen, welche die positiven Proben darstellen (Quelle: eigene)

3.2.2 Prävalenz STH, Schistosomiasis und anderer Protozoen

In der lichtmikroskopischen Untersuchung waren in 63,9 % der Proben Eier von *S. mansoni* aufzufinden. Bezüglich STH Infektionen konnten in 19,3 % der Proben Hakenwurmeier detektiert werden, in nur einer Probe fand sich *Trichuris trichuria* (0,3 %). In 6,4 % der Proben fanden zudem Larven von *Strongyloides stercoralis*. *Ascaris lumbricoides* wurde dagegen in keiner Probe gefunden. Hinsichtlich weiterer Protozoeninfektionen fand sich in einer großen Anzahl an Proben *Entamoeba coli* (63,9 %). Auch *Blastocystis hominis* (10,1 %) und *Iodamoeba bütschlii* (36,4 %) konnten detektiert werden.

Tabelle 4: Durch Lichtmikroskopie ermittelte Häufigkeiten von Helminthen sowie weiterer Protozoen mit 95 % Konfidenzintervallen (n Gesamt = 357). Negative Grenzen der Konfidenzintervalle entsprechen den Ergebnissen des mathematischen Modells und werden daher mit angegeben. Da eine negative Prävalenz praktisch nicht existieren kann, ist als untere Grenze von 0 auszugehen.

Parasit	Anzahl Positive (n)	Prävalenz in % (95% KI)
<i>S. mansoni</i>	228	63,9 (58,92-68,88)
Hakenwürmer	69	19,3 (15,2-23,4)
<i>T. trichuria</i>	1	0,3 (-0,27-0,89)
<i>S. stercoralis</i>	23	6,4 (3,85-8,95)
<i>E. coli</i>	228	63,9 (58,92-68,88)
<i>B. hominis</i>	36	10,1 (6,98-13,22)
<i>I. bütschlii</i>	130	36,4 (31,4-41,4)

3.3 Prävalenzen von *G. intestinalis* und *E. dispar* in Bezug auf Alter und Geschlecht der Studienteilnehmer

3.3.1 *G. intestinalis* und *E. dispar* Infektionen nach Altersmittelwerten

In den Tabellen 5 und 6 sind die Prävalenzen von *G. intestinalis* und *E. dispar* nach dem Mittelwert des Alters sowie geschlechtsspezifisch dargestellt. Der Altersmittelwert der für *G. intestinalis* positiven Studienteilnehmer lag bei 16,13 Jahren ($\pm 17,64$). Der Altersmittelwert der für *G. intestinalis* negativen Studienteilnehmer lag bei $24,33 \pm 18,4$ Jahren. Im Vergleich der beiden Mittelwerte mit Hilfe des T-Tests für unabhängige Stichproben fand sich ein deutlich signifikanter Unterschied von $p = 0,003$. Als Sensitivitätsanalyse wurde zudem ein nicht parametrischer Test (Mann-Whitney-U-Test) durchgeführt, welcher dieses Ergebnis bestätigte ($p < 0,001$).

Der Unterschied zwischen den Geschlechtern in Bezug auf eine Infektion mit *G. intestinalis* wurde mit dem Chi-Quadrat Test nach Pearson berechnet und war dagegen nicht signifikant ($p > 0,05$). Hinsichtlich der Infektionen mit *E. dispar* lag der Altersmittelwert der positiven Studienteilnehmer bei $22,56 \pm 17,58$ Jahren, die der negativen Studienteilnehmer bei $23,23 \pm 18,82$ Jahren. Sowohl der Vergleich der Altersmittelwerte der positiven und negativen Studienteilnehmer als auch deren Geschlecht ergab keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 5: Anzahl der positiven und negativen Fälle von *G. intestinalis* in Bezug auf den Mittelwert des Alters mit Standardabweichung in Jahren sowie innerhalb der beiden Geschlechter (prozentual).

	Positiv n = 53	Negativ n = 300	p-Wert
Alter (Jahre)	16,13 ± 17,64	24,33 ± 18,4	0,003 (T)
Geschlecht			
Männlich:	29 (17,3 %)	139 (82,7 %)	0,26 (χ^2)
Weiblich:	24 (13,0%)	161 (87,0 %)	
Gesamt:	53 (15,0 %)	300 (85,0 %)	

Tabelle 6: Anzahl der positiven und negativen Fälle von *E. dispar* in Bezug auf den Mittelwert des Alters mit Standardabweichung in Jahren sowie innerhalb der beiden Geschlechter (prozentual).

	Positiv n = 76	Negativ n = 277	p-Wert
Alter	22,56 ± 17,58	23,23 ± 18,82	0,779 (T)
Geschlecht			
Männlich:	31 (18,5 %)	137 (81,5 %)	0,18 (χ^2)
Weiblich:	45 (24,3%)	140 (75,7 %)	
Gesamt:	76 (21,5%)	277 (78,5%)	

3.3.2 Altersspezifische Prävalenz *G. intestinalis*

Bei der Betrachtung der Prävalenz von *G. intestinalis* innerhalb der einzelnen Altersgruppen wird ersichtlich, dass vor allem die Gruppen der 0-5 sowie der 6-10 Jährigen befallen sind. Die höchste Prävalenz findet sich in der Gruppe der 6-10 Jährigen (27,2 %). In den Altersgruppen ab 11-15 Jahren ist ein Abfall der Prävalenz zu beobachten, welche sich dann auf einem stabilen Niveau hält und in den obersten Altersklassen gering anzusteigen scheint. Allerdings ist zu beachten, dass aufgrund der geringen Fallzahlen hier nur eine eingeschränkte Interpretation möglich ist.

Tabelle 7: Durch PCR ermittelte Prävalenz von *G. intestinalis* innerhalb der einzelnen Altersgruppen (n = 357). Auch hier gilt wie oben: Negative Konfidenzintervalle entsprechen den Ergebnissen des mathematischen Modells und werden daher mit angegeben. Da eine negative Prävalenz praktisch nicht existieren kann, ist als untere Grenze von 0 auszugehen.

Altersgruppen	Positiv (n)	Negativ (n)	Prävalenz % (95% KI)
0-5 Jahre	7	20	25,9 (9,4-42,4)
6-10 Jahre	22	59	27,2 (17,5-36,9)
11-15 Jahre	15	69	17,9 (9,7-26,1)
16-20 Jahre	1	20	4,8 (-4,4-13,9)
21-30 Jahre	2	42	4,5 (-1,6-10,6)
31-40 Jahre	2	25	7,4 (-2,5-17,3)
41-50 Jahre	1	37	2,6 (-7,3-12,5)
51-60 Jahre	1	13	7,1 (-6,3-20,6)
>60 Jahre	3	18	14,3 (-0,6-29,3)

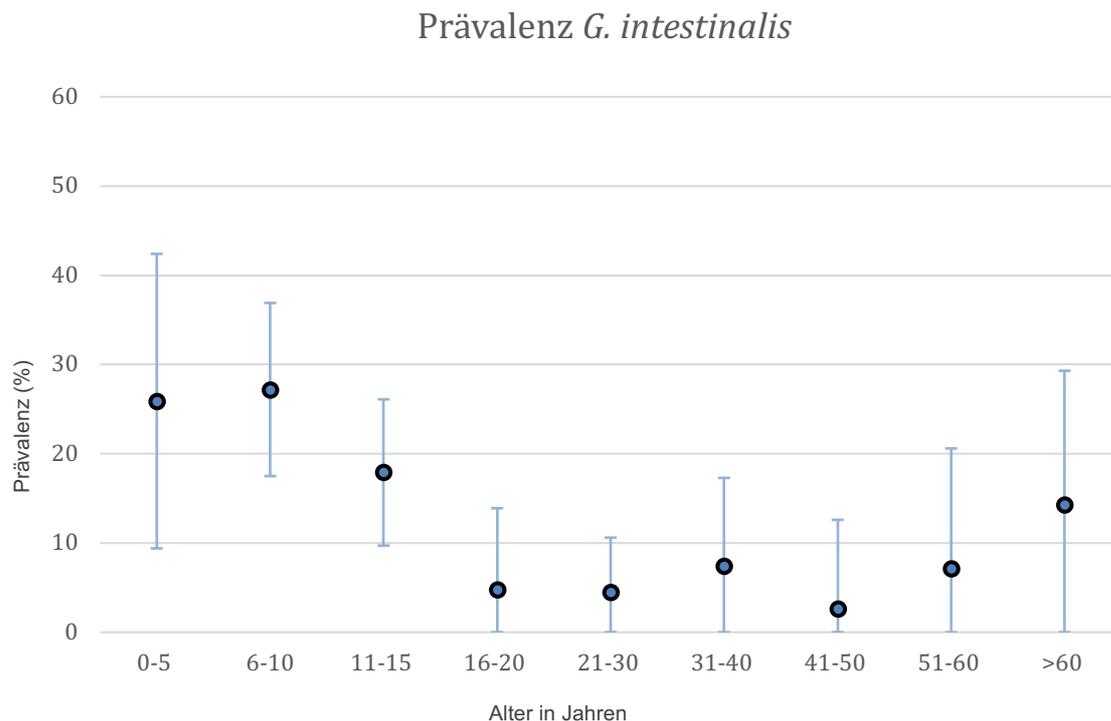


Abb. 7: Grafische Darstellung der Prävalenz von *G. intestinalis* innerhalb der einzelnen Altersgruppen mit Konfidenzintervallen (Quelle: eigene)

3.3.3 Altersspezifische Prävalenz *E. dispar*

Im Gegensatz zur Prävalenzverteilung von *G. intestinalis* in den Altersgruppen lässt sich bei den *E. dispar* Infektionen kein klarer Abfall der Prävalenz ab einem bestimmten Alter beobachten. Die höchsten Prävalenzen finden sich hier in der Gruppe der 0-5 Jährigen sowie der 16-20 Jährigen. Allerdings ist auch hier die geringe Fallzahl in den genannten Altersgruppen zu beachten, welche nur eine eingeschränkte Interpretation zulässt.

Tabelle 8: Durch PCR ermittelte Prävalenz von *E. dispar* innerhalb der einzelnen Altersgruppen (n Gesamt = 357) mit 95 % Konfidenzintervallen.

Altersgruppen	Positiv (n)	Negativ (n)	Prävalenz % (95%KI)
0-5 Jahre	9	18	33,3 (15,3-50,7)
6-10 Jahre	14	67	17,3 (8,8-25,2)
11-15 Jahre	17	67	20,2 (11,6-28,8)
16-20 Jahre	6	15	28,6 (9,3-47,9)
21-30 Jahre	11	33	25,0 (12,2-37,8)
31-40 Jahre	7	20	25,9 (9,4-42,4)
41-50 Jahre	6	32	15,8 (4,2-27,4)
51-60 Jahre	3	11	21,4 (-0,8-42,9)
> 60 Jahre	5	16	23,8 (5,6-42,0)

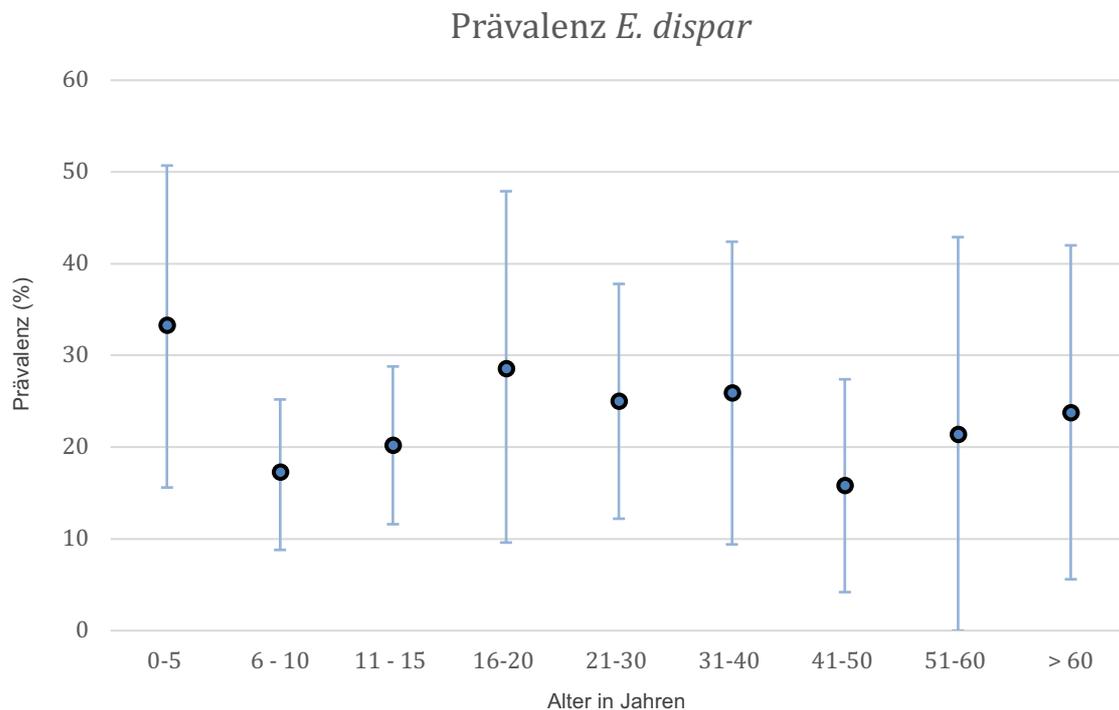


Abb. 8: Grafische Darstellung der Prävalenz von *E. dispar* innerhalb der einzelnen Altersgruppen mit Konfidenzintervallen (Quelle: eigene)

3.3.4 Einfluss des Alters und des Geschlechts auf Protozoeninfektionen

Um den Einfluss des Alters und des Geschlechts und damit deren Vorhersagewert für Infektionen mit *G. intestinalis* und *E. dispar* zu untersuchen, wurde ein univariates logistisches Modell berechnet. In dem Modell entspricht der Infektionsstatus (positiv/negativ) der dichotomisierten abhängigen Variablen, während Alter und Geschlecht als vermutete Risikofaktoren unabhängige Variablen darstellen. Die Altersgruppen wurden hierbei in ≤ 15 Jahre und > 15 Jahre unterteilt, somit waren auch die unabhängigen Variablen dichotom.

Die Ergebnisse der logistischen Regressionsanalyse hinsichtlich Alter und Geschlecht sind in Tabelle 9 dargestellt. Das Geschlecht war dabei kein signifikanter Vorhersagewert einer Infektion mit *G. intestinalis* oder *E. dispar*. Für *G. intestinalis* Infektionen war ein Alter ≤ 15 Jahre mit einer Odds Ratio (OR) von 4,4 ein signifikanter Prädiktor für eine Infektion.

Tabelle 9: Univariate logistische Analyse der Protozoeninfektionen *G. intestinalis* und *E. dispar* in Bezug auf die Altersgruppen und das Geschlecht

Risikofaktor	<i>G. intestinalis</i>		<i>E. dispar</i>	
	OR (95%KI)	<i>p</i>	OR (95%KI)	<i>p</i>
<i>Alter</i>				
≤ 15 Jahre	4,4 (2,13-9,1)	<0,001	0,97 (0,56-1,7)	0,925
> 15 Jahre	1		1	
<i>Geschlecht</i>				
Weiblich	1		1	
Männlich	0,78 (0,43-1,42)	0,41	1,421 (0,85-2,38)	0,18

3.4 Prävalenz Amöbenleberabszesse

Bei den Ultraschalluntersuchungen, die im Rahmen des SchistoControl Pilotprojektes im September 2016 zeitgleich mit der Stuhlprobenabgabe stattfanden, konnte kein ALA detektiert werden. In den Untersuchungen wurde das Abdomen und speziell die Leber dargestellt und standardisiert durchgefächert, um den Grad der durch Schistosomiasis verursachten Leberfibrose zu detektieren. Da jedoch kein Studienteilnehmer ALA-spezifische Beschwerden angab (rechtsseitiger Oberbauchschmerz, Fieber, Minderung des Allgemeinzustandes), war eine Detektion sehr unwahrscheinlich. Weiterhin sind die Ultraschalluntersuchungen im Vorfeld angekündigt worden und es war auch bekannt, dass dafür Ärzte auf der Insel waren. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass sich Patienten mit akuter Symptomatik wahrscheinlich vorgestellt hätten. Jedoch finden sich selbst bei Patienten mit gesichertem Leberabszess häufig zu diesem Zeitpunkt keine Amöbenzysten im Stuhl, weshalb eine eindeutig ätiologische Zuordnung nur mittels Antikörpertestung oder Analyse des Abszesspunktes möglich gewesen wäre.

3.5 Polyparasitismus

Betrachtet man alle lichtmikroskopischen Untersuchungsergebnisse der Stuhlproben, fällt auf, dass bei 97,2 % der Studienteilnehmer zum Zeitpunkt der Probenentnahme mindestens ein intestinaler Parasit nachgewiesen werden konnte. Dies beinhaltet neben pathogenen Parasiten auch nicht pathogene und nicht obligat pathogene Parasiten. Bei 74 % konnten mindestens zwei, bei 44,3 % sogar mindestens drei intestinale Parasiteninfektionen festgestellt werden. 76,5 % der Studienteilnehmer waren positiv für mindestens eine pathogene intestinale Parasiteninfektion. Bezüglich der Helmintheninfektionen waren 73,7 % positiv für mindestens eine Helmintheninfektion, 15,1 % waren positiv für mindestens zwei verschiedene Helmintheninfektionen. Hinsichtlich der untersuchten intestinalen Protozoen waren 84,6 % positiv für mindestens eine

Protozoeninfektion, 46,8 % waren positiv für zwei oder mehr Protozoeninfektionen. Die Prävalenz aller obligat pathogenen Protozoeninfektionen lag bei 12 %, was sich mit der lichtmikroskopisch ermittelten Prävalenz von *G. intestinalis* deckt, da Infektionen mit *E. histolytica* nicht detektiert werden konnten.

E. dispar, *I. bütschlii* sowie *B. hominis* wurden bei dieser Betrachtungsweise als nicht pathogen beziehungsweise nicht obligat pathogen angesehen.

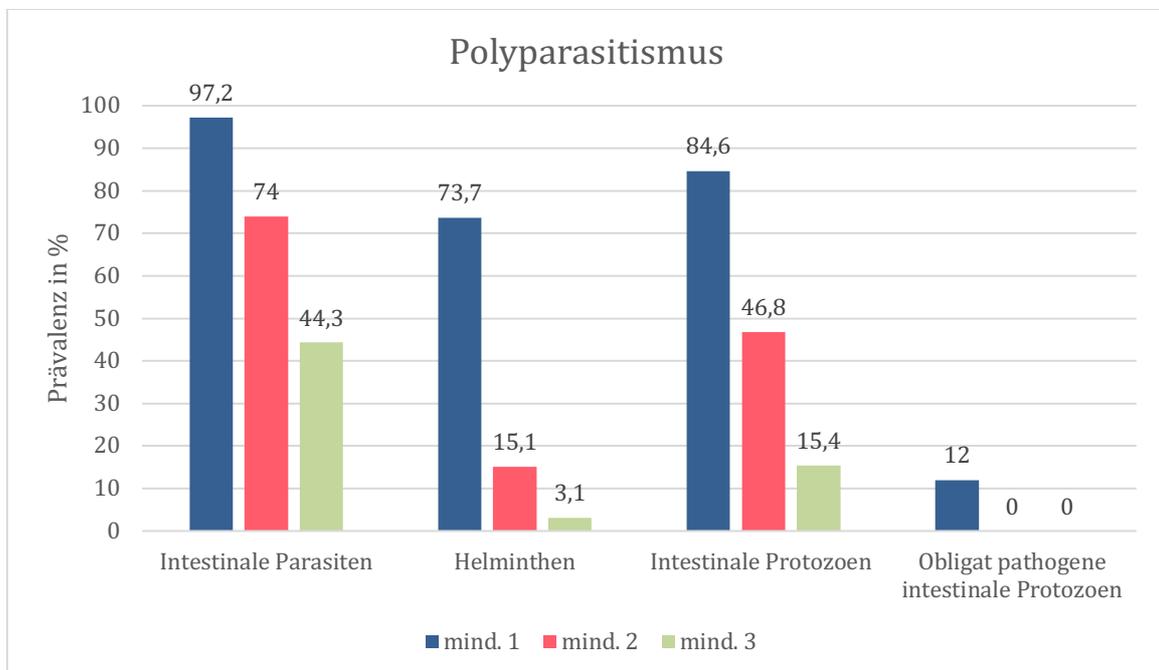


Abb. 9: Polyparasitismus bei den Studienteilnehmern im Säulendiagramm (Quelle: eigene)

3.6 Infektionen mit Schistosomiasis

Infektionen mit *S. mansoni* wurden mit drei unterschiedlichen Methoden getestet: Dem CCA Schnelltest, der SAF-Methode und der Kato-Katz Methode. Bei zwei CCA Schnelltestproben fehlten die Angaben, deshalb gilt für n Gesamt in dieser Zeile n = 355. In der mikroskopischen Untersuchung nach SAF-Anreicherung waren 63,9 % der Studienteilnehmer positiv für *S. mansoni*, die Kato-Katz Methode ergab eine Prävalenz von 70,3 % und der CCA Schnelltest 95 %.

Tabelle 10: Prävalenz von *S. mansoni* in den unterschiedlichen Testverfahren

Methoden	n Gesamt	n positiv	Prävalenz % (KI)
SAF Methode	357	228	63,9 (58,9-68,9)
Kato-Katz	357	251	70,3 (65,6-75,0)
POC-CCA	355	339	95,0 (92,7-97,3)

3.7 Testsensitivität

Die Diagnostik intestinaler Protozoeninfektionen wurde mittels zweier Testverfahren durchgeführt. Die mikroskopische Untersuchungsmethode nach SAF Konzentrierung wird als einfache und fast überall durchführbare Methode mit der aufwändigeren und teureren qPCR als Goldstandard verglichen.

Tabelle 11: Kreuztabelle mit Testergebnissen für *G. intestinalis* mit Prozentangaben

<i>G. intestinalis</i>	n PCR positiv	n PCR negativ	n Gesamt
Mikroskopie positiv	42 (97,7 %)	1 (2,3 %)	43 (12 %)
Mikroskopie negativ	12 (3,82 %)	302 (96,18 %)	314 (88 %)
n Gesamt	54 (15,1 %)	303 (84,1 %)	357 (100 %)

Tabelle 12: Kreuztabelle mit Testergebnissen für *E. dispar* mit Prozentangaben

<i>E. dispar</i>	n PCR positiv	n PCR negativ	n Gesamt
Mikroskopie positiv	48 (51,6 %)	45 (48,4 %)	93 (26,1 %)
Mikroskopie negativ	30 (11,4 %)	234 (88,6 %)	264 (73,9 %)
n Gesamt	78 (21,8 %)	279 (78,2 %)	357 (100 %)

Die Daten aus den dargestellten Kreuztabellen ergeben somit für die Mikroskopie zur Detektion einer *G. intestinalis* Infektion eine Sensitivität von $42/(42+12) = 0,78$ im Vergleich zur qPCR Untersuchung und eine Spezifität von $302/(1+302) = 0,99$. Für *E. dispar/E. histolytica* wird so eine Spezifität von $234/(234+45) = 0,84$ und eine Sensitivität von $48/(48+30) = 0,62$ errechnet.

4 Diskussion

Ziel der Studie war es, die Prävalenz intestinaler Protozoeninfektionen anhand einer repräsentativen Bevölkerungsstichprobe zu ermitteln sowie alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede herauszuarbeiten. Zudem wurden mittels qPCR die beiden lichtmikroskopisch nicht unterscheidbaren Amöbenspezies *E. histolytica* und *E. dispar* voneinander differenziert. Die erhobenen Daten sollen in der Folge als Basisdaten zur Überprüfung von Hygiene und WASH Maßnahmen herangezogen werden. Außerdem wurden Prävalenzdaten von Infektionen mit *S. mansoni* und STH erhoben.

Als Studienpopulation wurde die Bevölkerung der Insel Ijinga im Viktoriasee in Tansania ausgewählt, da sie bereits Studienpopulation des SchistoControl Projektes war und Hygienemarker für zukünftige WASH Interventionen evaluiert werden sollten. Durch den Mangel an Elektrizität und fließendem Wasser sowie nur sporadisch vorhandenen und möglicherweise schlecht gepflegten Sanitäreinrichtungen war von einer hohen Prävalenz an Infektionen mit intestinalen Protozoen, Schistosomiasis und STH auszugehen. Da Ijinga Island eine kleine Insel ohne direkte Verbindung zum Festland ist, kann die Bevölkerung nur als bedingt repräsentativ für die Gesamtheit der ländlichen Gebiete in Tansania gelten.

Die Ergebnisse zeigen eine hohe Prävalenz von *G. intestinalis* und *Entamoeba species pluralis*, wohingegen nach Diskrimination durch die qPCR keine Infektion mit *E. histolytica* nachgewiesen werden konnte. Im Folgenden werden diese Ergebnisse ausführlich diskutiert.

4.1 Diskussion des Studienkollektivs

Die Geschlechterverteilung der Studienpopulation war insgesamt ausgeglichen. In den Altersgruppen 31-40, 41-50 und 51-60 Jahre war der Anteil der Frauen größer, ein signifikanter Unterschied zu der Verteilung in der Gesamtstudienpopulation bestand jedoch nur in der Altersgruppe der 41 bis 50-jährigen. Dies ist möglicherweise auf das Fehlen einiger arbeitender männlicher Fischer oder Landwirte bei der Studiendurchführung zurückzuführen.

Das im Durchschnitt niedrige Alter der Studienpopulation und die Vielzahl an jungen Studienteilnehmern erklären sich einerseits durch den geringeren Altersmedian in Tansania, welcher bei 17,7 Jahren in der Gesamtbevölkerung liegt. Mehr als 63 % der Bevölkerung sind 24 Jahre alt und jünger (C.I.A., 2018). Andererseits wurden Befragungen und das Sammeln der Stuhlproben in der Schule der Insel durchgeführt, was allgemein zu einer hohen Quote an Studienteilnehmern im Schulalter führte. Dennoch war ein breites Spektrum an Altersklassen vertreten, sodass die Altersspannweite 85 Jahre betrug. Es waren außerdem Studienteilnehmer aus allen fünf Dörfern der Insel vertreten, weswegen die Erhebung als repräsentativ für die gesamte Insel gelten darf.

4.2 Diskussion der Methodik

4.2.1 Nachweis von Protozoen- und Helmintheninfektionen

Die Erhebung der Prävalenz wurde aus Stuhl- und Urinproben der Bevölkerungsstichprobe auf Ijunga Island ermittelt. Obwohl aufgrund der Schätzwerte rechnerisch nur 196 Proben benötigt worden wären, entschieden wir uns dazu, 400 Proben zu untersuchen, um transportbedingte Schäden und Verluste kompensieren zu können.

Zur mikroskopischen Untersuchung wurden die Stuhlproben mittels SAF Methode fixiert und nach Sedimentation durch Zentrifugation konzentriert.

Im Gegensatz zur früher häufig angewandten Merthiolate-Iodine-Formaldehyde (MIF) Methode ist der Nachweis von *G. intestinalis* und *E. histolytica/dispar* bei Nutzung der SAF Methode signifikant sensitiver. Beim Nachweis von Helmintheninfektionen bestehen allerdings keine Sensitivitätsunterschiede (Yang und Scholten, 1977).

Für die Extraktion der DNA aus den Stuhlproben wurde das QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit® der Firma Qiagen verwendet. Die bei der Extraktion gewonnene DNA beträgt laut Herstellerangaben 5-50 µg, welche in 0,2 ml Puffer gelöst wird. Bei mehreren Kontrollen mittels eines Qubit® 2.0 Fluorometers lag die DNA Konzentration nach Extraktion in der Lösung bei 0,5-5 µg/ml. Zwar liegt dieser Wert etwas unter dem erwarteten Wert von Qiagen, jedoch eignet sich das Kit dennoch als zuverlässige und einfache Methode zur DNA Extraktion aus Stuhlproben. Zudem war der Reinheitsgrad der DNA in Vergleichsstudien zufriedenstellend und der Amplifikationserfolg in der PCR somit zuverlässig und effizient (Claassen *et al.*, 2013).

Auch die Stuhl-PCR zum Nachweis von *G. intestinalis*, *E. histolytica* und *E. dispar* wurde mittels eines Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Zum Nachweis von Protozoeninfektionen ist die PCR sensitiver als die Mikroskopie und gilt insgesamt als empfindlichstes diagnostisches Verfahren (Stark *et al.*, 2011).

Im Vergleich zur qPCR zeigten auch Antigentests eine hohe Spezifität jedoch eine deutlich geringere Sensitivität. Vermeintlich falsch positive Testergebnisse der qPCR im Vergleich weisen aber wohl eher auf die hohe Sensitivität der Methode hin (Gottfred-Rasmussen *et al.*, 2016). Für die Anwendung einer qPCR sprechen außerdem die sichere Differenzierung der Amöbenspezies, welche Antigentests und Mikroskopie nicht sicher bieten können (Britten *et al.*, 1997). Ein großer Nachteil des molekularbiologischen Pathogennachweises mittels qPCR ist der finanzielle Aufwand, der in diesem Fall mit etwa 6 € an Kosten allein für die Reagenzien pro Probe relativ hoch liegt. Des Weiteren sind Geräte und Ausrüstung wie beispielsweise Thermocycler und Gefrierschränke sowie geschultes Personal zur adäquaten Durchführung einer PCR notwendig. Eine solche Infrastruktur ist leider nicht in allen Regionen der Welt verfügbar.

Um eine möglichst genaue Prävalenz zu ermitteln und gleichzeitig aber die Vergleichbarkeit mit vorhandenen Studien zu wahren, wählten wir in dieser Arbeit die Mikroskopie und die PCR Untersuchung als Nachweismethoden aus.

In dieser Studie konnten beim Vergleich beider Methoden unter Verwendung der qPCR als Referenzmethode Sensitivitäten und Spezifitäten bei der Detektion intestinaler Protozoeninfektionen ermittelt werden. Die Sensitivität und Spezifität der Stuhlmikroskopie nach SAF Fixierung betrug 78 % und 99 % für *G. intestinalis* sowie 62 % und 84 % für *E. dispar*. Bezüglich *G. intestinalis* wurde in einer ähnlichen Studie sogar eine mikroskopische Spezifität von 100 % beobachtet. Die Sensitivität war jedoch in besagter Studie mit 50,7 % deutlich geringer (Beyhan und Tas Cengiz, 2017). Hinsichtlich *E. dispar* wurde eine Sensitivität von 52,2 % und eine Spezifität von 75,2 % für die Mikroskopie gegenüber der PCR beschrieben (ElBakri *et al.*, 2013). Dies war noch etwas geringer als in der vorliegenden Arbeit. Beide Studien sprechen daher für den Einsatz der PCR als weitaus sensitivere Methode in der Routinediagnostik intestinaler Protozoeninfektionen. Die qPCR ermöglicht darüber hinaus eine Quantifizierung der gewonnenen DNA. Somit lassen sich Aussagen über die Schwere des Befalls treffen. Gründe für die deutlich niedrigere Sensitivität der Mikroskopie gegenüber der PCR sind einerseits die Untersucherabhängigkeit und die Qualität der Probenaufbereitung sowie die von Tag zu Tag variable Zystenausscheidung.

4.2.2 Nachweis *S. mansoni*

Der Nachweis von *S. mansoni* wurde durch die Mikroskopie erbracht und durch die Kato-Katz Methode sowie den POC-CCA Test ergänzt.

Nachdem Vor- und Nachteile der Stuhlmikroskopie bereits diskutiert worden sind, gilt die nähere Betrachtung der Kato-Katz Methode und dem CCA Schnelltest.

Ein Vorteil der Kato-Katz Methode ist die Möglichkeit der Quantifizierung einer Schistosomeninfektion durch die Zählung der Eier. Hierdurch kann eine Aussage über den Schweregrad der Infektion getroffen werden. Außerdem können bei der

mikroskopischen Untersuchung gleichzeitig auch andere Geohelminthen detektiert werden. Nachteilig wirken allerdings zum Einen auch hier die Untersucherabhängigkeit sowie zum Anderen die geringere Testsensitivität gegenüber dem POC-CCA Test und der qPCR (Fuss *et al.*, 2018).

Bei der Verwendung des CCA Schnelltests hingegen können falsch negative Resultate bei Individuen mit einer geringen Wurmlast, zum Beispiel in den ersten Wochen nach einer Infektion, auftreten. Auf der anderen Seite können Harnwegsinfektionen und Hämaturie zu falschpositiven Testergebnissen führen. Dennoch zeigten Studien im Vergleich zur Kato-Katz Methode eine höhere Sensitivität und eine annähernd so hohe Spezifität, was den CCA Schnelltest gemeinsam mit der schnellen und simplen Durchführbarkeit zu einem wertvollen Instrument in der Diagnostik von *S. mansoni* Infektionen macht (Mazigo *et al.*, 2018; Okoyo *et al.*, 2018; Siqueira *et al.*, 2016).

4.2.3 Einschränkungen und Limitationen der Studie

Mögliche Einschränkungen und Limitationen im Verlauf der Studie sollen in diesem Kapitel diskutiert werden. Zunächst ist die oben schon beschriebene Verschiebung des Geschlechterverhältnisses in manchen Altersgruppen zu nennen. Durch die Sammlung der Stuhlproben direkt in den Dörfern wurde versucht, dieses Problem zu umgehen. Da einige Fischer jedoch regelmäßig längere Zeit, zum Teil auch bis zu mehreren Wochen, in den umliegenden Gewässern unterwegs sind, war ein Überwiegen von Frauen in dieser Altersgruppe zu erwarten. Des Weiteren wurden hinsichtlich der Methodik keine Antigentests zur Detektion von Protozoeninfektionen durchgeführt, was den Vergleich mit anderen Studien limitiert. Einige Autoren sehen in der Kombination von Antigentests und PCR die sensitivste Nachweismethode für Protozoeninfektionen (Gofred-Rasmussen *et al.*, 2016, 187-190). Die Prävalenz intestinaler Protozoeninfektionen in den einzelnen Altersgruppen ist durch die geringe Fallzahl teilweise nur eingeschränkt beurteilbar. Um dies auszugleichen, müsste eine größere Bevölkerungsstichprobe mit entsprechenden Ressourcen

untersucht werden. Bei der Angabe der Prävalenzen der STH und weiterer Protozoeninfektionen außer *G. intestinalis*, *E. dispar* und *E. histolytica* ist zu beachten, dass diese nur durch die Mikroskopie bestimmt worden sind. Da bei der Mikroskopie einerseits nur eine Stuhlprobe pro Patient untersucht wurde, aber die Ausscheidung von Helminthen und deren Eier im zeitlichen Verlauf variiert, sollten die Ergebnisse unter diesem Gesichtspunkt nur als grober Richtwert betrachtet werden. Zudem ist die Mikroskopie als alleinige Nachweismethode häufig fehlerbehaftet, da sie untersucherabhängig ist. Abschließend war die Ermittlung von Risikofaktoren in Bezug auf Protozoeninfektionen nur für das Alter und das Geschlecht möglich. Für eine genaue Untersuchung der Risikofaktoren wäre daher zusätzlich zur Labordiagnostik eine Fragebogenstudie notwendig.

4.3 Diskussion der Prävalenzdaten

4.3.1 Prävalenz von *G. intestinalis*

Infektionen mit *G. intestinalis* gehören zu den häufigsten intestinalen Protozoeninfektionen. Zwischenzeitlich wurde die Giardiasis als Infektionserkrankung sogar in die Gruppe der vernachlässigten Erkrankungen (engl. NTDs) durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) aufgenommen (Savioli *et al.*, 2006). *Giardien* sind neben *Cryptosporidien* die wichtigsten über das Wasser übertragenen Protozoen (Omarova *et al.*, 2018). In der vorliegenden Arbeit war die mikroskopische Prävalenz 12 %, die qPCR detektierte eine Prävalenz von 15,1 %. Diese Ergebnisse zeigen eine ähnliche Infektionsrate wie jene, die Speich *et al.* bei ihrer Studie auf Pemba Island im Osten Tansanias fanden. Die Prävalenz war dabei mit 16,4 % vergleichbar hoch (Speich *et al.*, 2013, 3). In Daressalam zeigte sich 2011 eine deutlich geringere Prävalenz von 4,6 % bei Kleinkindern (Tellevik *et al.*, 2015). Diese ist womöglich auf das städtische Umfeld mit den verbesserten hygienischen und sanitären

Bedingungen sowie dem Zugang zu saubererem Trinkwasser zurückzuführen. Zudem findet in Städten kaum Viehzucht statt, was den zoonotischen Transmissionszyklus als wichtigen Risikofaktor für eine Infektion reduziert (Feng und Xiao, 2011). Forsell *et al.* detektierten bei einer Studie in Sansibar hingegen eine weitaus höhere Prävalenz von 53,4 % für *G. intestinalis*. Diese hohe Prävalenz ist wahrscheinlich durch den Umstand zu erklären, dass Proben von Patienten untersucht worden sind, die mit Beschwerden Gesundheitszentren aufsuchten. Interessant ist in jener Erhebung aber auch die deutliche Divergenz der Ergebnisse der qPCR und der Mikroskopie (13,8 %). Dies zeigt einmal mehr, wie wichtig molekularbiologische Methoden zum Nachweis der tatsächlichen Prävalenz intestinaler Protozoeninfektionen sind (Forsell *et al.*, 2016). Auch in anderen Regionen Subsahara-Afrikas wurde gezeigt, dass Infektionen mit *G. intestinalis* hochprävalent sind. Während bei einer Erhebung in Ghana im Jahr 2014 16,8 % der untersuchten Kinder positiv für *G. intestinalis* waren (Walana, 2014 Jan), wurde bei einer Untersuchung mehrerer ländlicher Dörfer in Uganda sogar eine Prävalenz von 40,7 % erhoben (Johnston *et al.*, 2010). Auch im arabischen und vorderasiatischen Raum fanden sich hohe Prävalenzen von *G. intestinalis*. In ländlichen Provinzen rangierten die Prävalenzen von 10,6-17,5 % in verschiedenen Regionen des Iran bis hin zu 28,1 % im Jemen (Abbaszadeh Afshar *et al.*, 2020; Al-Mekhlafi, 2017; Sarkari *et al.*, 2016).

Da *G. intestinalis* vor allem über verunreinigtes Trinkwasser übertragen wird, sind zur Senkung der Prävalenz neben dem Zugang zu adäquaten Sanitäreinrichtungen und verbesserten Hygienestandards auch die Bereitstellung von gefiltertem und sauberem Trinkwasser von großer Bedeutung (Betancourt und Rose, 2004 Dec 9).

4.3.2 Prävalenz und Differenzierung von *E. histolytica* und *E. dispar*

Die beiden Amöbenspezies *E. histolytica* und *E. dispar* sind unter dem Mikroskop nicht voneinander differenzierbar. *Entamoeba coli* ist eine weitere, nicht pathogene Amöbe, die sich durch Größe und Anzahl der Zellkerne von *E.*

histolytica und *E. dispar* unterscheidet. Da die mikroskopische Prävalenz von *E. coli* mit 63,9 % recht hoch lag, fanden sich in einigen Proben Mischinfektionen von *E. histolytica/dispar* und *E. coli*. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit für eine Verwechslung, da *E. coli* Zysten je nach Größe und Lage *E. histolytica/dispar* Zysten sehr ähneln können.

In Anbetracht dieser Gründe war eine molekularbiologische Untersuchung zur genauen Angabe der Prävalenz von *E. histolytica* und *E. dispar* notwendig. Die tatsächlich detektierte Prävalenzen von 21,8 % für *E. dispar* sowie 0 % für *E. histolytica* zeigen, dass die pathogene Art in der Bevölkerungsstichprobe praktisch nicht vorkommt. Somit entsprechen auch die positiven Mikroskopieergebnisse ausschließlich *E. dispar* Infektionen. Diese Ergebnisse stützen die in Kapitel 1.4.2 aufgestellten Eingangshypothesen. Die Differenz der mikroskopisch ermittelten Prävalenz von 26,1 % zu den PCR Ergebnissen lässt dann eine Verwechslung mit anderen apathogenen *Entamoeba species pluralis* unter dem Lichtmikroskop vermuten. Einige andere Studien kommen hinsichtlich der Prävalenz von *E. histolytica/dispar* nach PCR Diskrimination der Amöbenspezies zu einem ähnlichen Ergebnis. So wurden bei einer Studie in Daressalam nach Anwendung der PCR ebenfalls keine Infektionen mit *E. histolytica* gefunden (Tellevik *et al.*, 2015). Auch bei einer 2016 durchgeführten Studie an 174 Krankenhauspatienten in Sansibar fand sich nur eine einzige positive Probe für *E. histolytica* (Forsell *et al.*, 2016). Bei anderen Studien aus Tansania, bei denen die Prävalenz für *E. dispar/histolytica* nur mikroskopisch getestet und zwischen 13,6 % und 18 % angegeben wurde (Mazigo *et al.*, 2010; Speich *et al.*, 2013), scheinen somit ebenso wie in der vorliegenden Arbeit der Großteil, wenn nicht sogar alle positiven Proben Infektionen mit *E. dispar* zu sein. Dies legt nahe, dass in vielen ländlichen Regionen, zumindest in Tansania, die Prävalenz von *E. histolytica* überschätzt wird. Aber auch überregional zeigen sich ähnliche Ergebnisse. So hatten Hemmati *et al.* bei einer ähnlichen Studie im Iran ebenso keine Infektionen mit *E. histolytica* gefunden (Hemmati *et al.*, 2017). Auch bei Studien an Schulkindern und Gefängnisinsassen in Äthiopien sowie bei Schulkindern in Brasilien konnten in keiner der mikroskopisch für den *Entamoeba*

Komplex positiven Proben mittels qPCR *E. histolytica* nachgewiesen werden (Kebede *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2011).

Unsere Erkenntnisse stützen damit die These von Efunshile *et al.*, nach der die tatsächliche Prävalenz von *E. histolytica* weltweit überschätzt wird. Auch in seiner Studie in Nigeria fand er bei 199 gesunden Schulkinder keine Infektion mit *E. histolytica* (Efunshile *et al.*, 2015). Eine Überdiagnostik von *E. histolytica* aufgrund von inadäquaten mikroskopischen Ergebnissen kann so zu einer unnötigen Therapie von Patienten führen. Weiterhin könnte dies dazu führen, dass Kolitiden anderer Genese fälschlicherweise mit Medikamenten der Amöbiasistherapie behandelt werden. Auf der anderen Seite kann eine nicht erkannte invasive Amöbiasis zu schweren Komplikationen wie ALA und nekrotisierenden Kolitiden mit im schlimmsten Falle Todesfolge führen (Efunshile *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2009; Wanke *et al.*, 1988).

Dass die Prävalenz von *E. histolytica* Infektionen nicht aus dem Fokus der Forschung geraten sollten, zeigen auch Studien aus dem Nordosten Brasiliens sowie aus dem Norden Indiens. Calegar *et al.* konnten in Brasilien von ursprünglich 22 in der Mikroskopie für den *Entamoeba* Komplex positiven Proben nach Differenzierung durch die PCR in immerhin 8 Proben *E. histolytica* Infektionen nachweisen (Calegar *et al.*, 2016). In Indien fanden Nath *et al.* sogar eine Prävalenz von 13,7 % (Nath *et al.*, 2015).

Gemeinsam mit den Ergebnissen der beschriebenen Studien legen die Prävalenzdaten nahe, dass eine adäquate Angabe der Prävalenz von *E. histolytica* und *E. dispar* nur nach PCR Diskrimination erfolgen kann. Nur so können valide und vergleichbare Daten über die tatsächliche Prävalenz erhoben werden. Zudem fehlt es in vielen Regionen, vor allem auf dem afrikanischen Kontinent an regionalen Daten und damit auch an Wissen über die Verbreitung von Infektionen. Daher sind wissenschaftliche Kollaborationen von Forschern aus aller Welt zur Schließung dieser Lücken dringend erforderlich.

4.3.3 Prävalenz von STH und apathogenen Protozoen

Die mikroskopisch erhobene Prävalenz für Hakenwurminfektionen in dieser Studie war 19,3 %. Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer größeren Querschnittsstudie aus Tansania, bei der eine Prävalenz von 17 % detektiert wurde (Riess *et al.*, 2013). Mazigo *et al.* fanden sogar eine noch höhere Prävalenz von 25,2 %, wobei hier retrospektiv Daten von Patienten mit Krankenhausaufenthalten analysiert wurden. Deshalb war hier wohl die Prävalenz etwas höher als bei einer Stichprobe in der Normalbevölkerung, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall war (Mazigo *et al.*, 2010). Die mikroskopisch erhobene Prävalenz für *S. stercoralis* war 6,4 %. Eine Studie aus dem Jahr 2014 in Tansania zeigte bei der mikroskopischen Untersuchung von Stuhlproben eine ähnlich hohe Prävalenz von 7,4 % (Knopp *et al.*, 2014). Da die SAF-Methode als wenig sensitiv für den Nachweis einer Strongyloidesinfektion angesehen wird, ist anzunehmen, dass die reale Prävalenz deutlich höher liegt (Ericsson *et al.*, 2001). *Ascaris lumbricoides* wurde in der vorliegenden Arbeit nicht detektiert. Eine niedrige Prävalenz dieses Parasiten fanden auch Mazigo *et al.* bei ihrer Studie im Jahr 2010. Zudem fanden Siza *et al.* ebenfalls keine Infektionen mit *A. lumbricoides* bei Schulkindern in Mwanza. Womöglich sind die Beschaffenheit der Böden sowie klimatische Bedingungen Gründe für die geringe Infektionsrate (Siza *et al.*, 2015). Insgesamt zeigt sich eine hohe STH Prävalenz, die auf die Exposition der Studienbevölkerung gegenüber den Risikofaktoren einer Infektion zurückzuführen ist. Diese sind neben einer ländlichen Wohnlage und Landwirtschaft mit Viehzucht, mangelnder Zugang zu WASH sowie ein niedriger sozioökonomischer Status (Hotez *et al.*, 2006; Menzies *et al.*, 2014). Obwohl sich die WHO zum Ziel gesetzt hat, die STH Prävalenz über präventive Chemotherapie-Kampagnen (MDAs) deutlich zu reduzieren, treten häufig Reinfektionen mit teilweiser höherer Intensität auf. Auch hier sind Gesundheitsaufklärung und WASH Maßnahmen notwendig, um dieses Ziel langfristig zu erreichen (Parija *et al.*, 2017; WHO, 2012).

Neben den bereits diskutierten Protozoeninfektionen mit *G. intestinalis*, *E. histolytica* und *E. dispar* fanden wir weitere Infektionen mit den nicht obligat pathogenen Protozoen *E. coli*, *B. hominis* und *I. bütschlii*. Deren Prävalenzen lagen in der mikroskopischen Untersuchung bei 63,9 %, 10,1 % und 36,4 %.

Ähnlich hoch war die Prävalenz von *E. coli* mit 51,5 % bei einer Datenerhebung bei Kindern auf Pemba Island. Während die Prävalenz für *B. hominis* etwas höher war, war sie für *I. bütschlii* niedriger (Speich *et al.*, 2013). Auch in Nordghana wurden hohe Prävalenzen dieser Protozoeninfektionen gefunden. Verweij *et al.* detektierten für *E. coli* eine Prävalenz von 52,4 %, 20,3 % für *I. bütschlii* und 42,3% für *B. hominis* (Verweij *et al.*, 2003, 1153-1156). Ähnliche Ergebnisse zeigte auch eine Studie in Taabo in der Elfenbeinküste. Hier lag die Prävalenz von *E. coli* bei 45,0 % und von *B. hominis* bei 35,4 %. (Schmidlin *et al.*, 2013). Auch in einer Studie bei Lebensmittelhändlern im südlichen Iran waren 24,3 % der Probanden mit *B. hominis* infiziert (Heydari-Hengami *et al.*, 2018). Allgemein ist daher von einer hohen Prävalenz dieser nicht obligat pathogenen Protozoeninfektionen auszugehen. Wie auch die Infektion mit den intestinalen Protozoen *G. intestinalis* und *E. histolytica/dispar* sind auch *B. hominis*, *E. coli* und *I. bütschlii* hygieneassoziiert und weisen daher die gleichen Risikofaktoren auf (Schmidlin *et al.*, 2013). Da jene weithin als apathogen gelten, rufen sie keine Symptome hervor und eignen sich daher besonders als Marker zum Monitoring der Maßnahmen zur WASH Verbesserung. Hiervon muss man *B. hominis* wohl ausschließen, da eine Infektion laut einiger Autoren zu allgemeinen Krankheitssymptomen wie Übelkeit, Bauchschmerzen und Fatigue führen kann. Dies wird jedoch in der Literatur kontrovers diskutiert (Khademvatan *et al.*, 2017; Udkow und Markell, 1993). Einen deutlichen Zusammenhang zwischen *Blastocystis* Infektionen und intestinalen Krankheitssymptomen konnte beispielsweise bei einer Studie an Schulkindern in Brasilien gezeigt werden. Die Prävalenz *Blastocystis species pluralis* lag dort bei 31,8 % (Segui *et al.*, 2017). Unabhängig davon gelten *E. coli* und *I. bütschlii* als apathogene Protozoeninfektionen und können vermutlich zum Monitoring der WASH Maßnahmen herangezogen werden.

4.4 Prävalenz *S. mansoni* und Koinfektionen

Die Schistosomiasis ist eine der häufigsten NTDs und findet auf vier Kontinenten Verbreitung. Es sind schätzungsweise 200 Millionen Menschen weltweit infiziert, 20 Millionen davon sind schwer erkrankt (Chitsulo *et al.*, 2000). Die Prävalenz der Schistosomiasis wird in Tansania aktuell auf 51,5 % geschätzt, in manchen Regionen liegt sie sogar bei bis zu 100 % (Mazigo *et al.*, 2012; Rollinson *et al.*, 2013). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine hohe Prävalenz detektiert, die sich in den verschiedenen diagnostischen Tests unterscheidet. Während in der mikroskopischen Untersuchung 63,9 % der Proben positiv waren, zeigte die Kato-Katz Methode eine Prävalenz von 70,3 % und der CCA Schnelltest sogar von 95 %. Eine deutliche Divergenz in den Ergebnissen der beiden Tests fanden auch Casacuberta *et al.* bei einer Studie an Schülern in der Region Mwanzas. Während die mittels Kato-Katz gemessene Prävalenz bei 42,6 % lag, waren bei der Messung mittels POC-CCA 75,0 % der Probanden positiv. Die Autoren beschreiben weiterhin, dass sogar ein einziger CCA Schnelltest sensitiver sei, als sechs Kato-Katz Ausstriche (Casacuberta *et al.*, 2016). In einer ägyptischen Studie erwies sich auch die PCR als deutlich sensitiver als die Kato-Katz Methode (Abdel-Hafeez *et al.*, 2015).

Die Divergenz zwischen den Prävalenzdaten der beiden mikroskopischen Methoden ist nicht ganz klar zu eruieren. Ein Grund für die geringere Prävalenz von *S. mansoni* bei der SAF Methode in dieser Arbeit könnten die nicht ganz optimalen Lagerungsbedingungen gewesen sein, aus einigen Röhrchen war beispielsweise etwas Konservierungsflüssigkeit ausgelaufen. Möglicherweise blieben auch einige Eier in dem mit Gaze bedecktem Metallsieb hängen. Des Weiteren wurde nur ein Aliquot des SAF Sediments durchgemustert. Bei Untersuchung weiterer Aliquote wäre höchstwahrscheinlich eine höhere Prävalenz detektiert worden.

Eine Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Infektionen mit intestinalen Protozoen und Infektionen mit *S. mansoni* ist durch die hohe Prävalenz der *S. mansoni* Infektionen nicht möglich. Es lässt sich daher keine Aussage darüber treffen, ob eine höhere Prävalenz intestinaler Protozoeninfektionen mit einer

höheren Prävalenz von Schistosomiasis assoziiert ist. Eine solche Untersuchung müsste in einem Gebiet mit deutlich niedrigerer Schistosomiasis-Prävalenz durchgeführt werden.

4.5 Prävalenz *G. intestinalis* und *E. dispar* in Bezug auf Alter und Geschlecht

Um die erhobene Prävalenz der Studienpopulation auf die Gesamtbevölkerung der Insel zu beziehen, wurden die Daten mit 95-prozentigen Konfidenzintervallen angegeben. Neben der Zufallsauswahl wurden auch hierdurch etwaige Verzerrungen durch die Selektion der Studienpopulation minimiert.

Hinsichtlich möglicher Risikofaktoren wurden auch in den Arbeiten von Choy *et al.* in Malaysia, Matthys *et al.* in Tadschikistan sowie Johnston *et al.* in Uganda der Zusammenhang von Geschlecht und Alter mit intestinalen Protozoeninfektionen untersucht. Die Infektionsrate intestinaler Protozoeninfektionen wies hierbei wie in der vorliegenden Arbeit keinen signifikanten Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Studienteilnehmer auf.

Da beide Geschlechter hinsichtlich der Risikofaktoren dieselbe Exposition und denselben mangelnden Zugang zu WASH haben, war ein Unterschied in der Prävalenz auch nicht zu erwarten. Die Ergebnisse einer Studie in Kamerun, nach denen die Infektionsrate intestinaler Protozoen bei Frauen signifikant höher war, können hier nicht bestätigt werden (Mbuh *et al.*, 2009).

Hinsichtlich des Alters zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied bei Infektionen mit *G. intestinalis* ($p < 0,05$). Dieser Zusammenhang wurde auch mit Hilfe eines univariaten logistischen Modells untersucht und bestätigt. Auch Coulibaly *et al.* und Johnston *et al.* fanden bezüglich der Infektionen mit *G. intestinalis* signifikant häufigere Infektionen in jüngeren Individuen. Der Anstieg der Prävalenz in den Altersgruppen der 51-60 Jährigen sowie der über 60 Jährigen ist aufgrund der zu geringen Fallzahlen zu vernachlässigen.

Eine höhere Prävalenz bei jüngeren Studienteilnehmer könnte auf den geringeren Hygienegebrauch im Vergleich zu Erwachsenen und damit eine größere Exposition gegenüber den Risikofaktoren intestinaler Protozoeninfektionen zurückzuführen sein.

Zudem kann bei häufigen Reinfektionen eine (Teil-)immunität gegenüber Infektionen ausgebildet werden, bei dem Krankheitssymptome nur in geringerem Ausmaß bis gar nicht auftreten. Allerdings werden Betroffene trotzdem von *G. intestinalis* besiedelt, welche weiterhin Zysten produzieren und andere Individuen infizieren können (Solaymani-Mohammadi und Singer, 2010 Nov). Laut Seguí *et al.* könnten auch die verschiedenen Genotypen Auswirkungen auf das Alter und Geschlecht des befallenen Wirtes haben (Seguí *et al.*, 2018).

Obwohl bei Infektionen mit *E. dispar* in der Altersgruppe der 0 bis 5 Jährigen die höchste Prävalenz zu verzeichnen war, korrelierte ein junges Alter dagegen nicht signifikant mit einer vermehrten Infektionsrate. Des Weiteren scheint die Prävalenz über die verschiedenen Altersklassen eher gleichmäßig verteilt zu sein. Jedoch muss auch hier angemerkt werden, dass die Interpretation durch die geringen Fallzahlen in den älteren Bevölkerungsgruppen eingeschränkt ist.

Bei der Einordnung des Zusammenhangs zwischen Alter und Infektionen mit *E. dispar* in die aktuelle Literatur werden im Folgenden auch Infektionen mit *E. histolytica* betrachtet, da Prävalenzen in Studien häufig undifferenziert für beide Spezies angegeben werden. Für Infektionen mit *E. histolytica/dispar* wird die Beziehung zum Infektionsalter unterschiedlich skizziert. In mehreren Studien wurde eine höhere Prävalenz bei Kindern als bei Erwachsenen beschrieben. Dies ist wahrscheinlich ebenso wie bei Infektionen mit *G. intestinalis* auf das weniger ausgeprägte Hygieneverhalten von Kindern zurückzuführen. Außerdem besteht bei Ansammlungen von Kindern an einem Ort, wie dies beispielsweise in der Schule oder auf Spielplätzen der Fall ist, eine größere Infektionsgefahr durch eine größere Anzahl an potenziellen Überträgern (Noor Azian *et al.*, 2007 Jun; Tasawar *et al.*, 2010).

Oyibo *et al.* dagegen zeigten in Nigeria, dass Infektionen mit *E. histolytica/dispar* häufiger in Erwachsenen als in Kindern vorkommen. Allerdings wurden in ihrer Studie Krankenhauspatienten mit gastrointestinalen Beschwerden untersucht,

was die Altersverteilung möglicherweise verzerrt (Oyibo *et al.*, 2013). Ebenso zeigte sich aber auch bei einer Erhebung in ländlichen malaysischen Regionen eine höhere Prävalenz für *E. histolytica/dispar* bei Erwachsenen als bei Kindern (Nguí *et al.*, 2012). In der vorliegenden Studie ist die Altersverteilung bei Infektionen mit *E. dispar* interessanterweise konstant und zeigt keine signifikanten Häufungen in bestimmten Altersgruppen. Zu Bedenken ist hierbei allerdings, dass sich die vorliegende Arbeit nur auf die Amöbenspezies *E. dispar* bezieht, weswegen ein Vergleich mit anderen Studien zur Altersassoziation nur bedingt möglich ist. Warum nicht vermehrt jüngere Studienteilnehmer betroffen sind, wie es bei Infektionen mit *G. intestinalis* der Fall ist, ist nicht eindeutig zu klären. Eine mögliche Erklärung wäre eine fehlende Immunantwort auf die nicht obligat pathogene *E. dispar*, weswegen nach Infektionen keine (Teil-) Immunität ausgebildet werden würde wie jene bei *G. intestinalis*. Auch muss man als Möglichkeit in Betracht ziehen, dass sich bei einer größeren Studienpopulation ein ähnlicher Alterstrend für *E. dispar* Infektionen zeigen könnte wie für Infektionen mit *G. intestinalis*. Dagegen spricht eine Studie in einer ländlichen Gemeinde in Venezuela, bei der die Prävalenz von Infektionen mit *E. dispar* bei Erwachsenen über 18 Jahren deutlich höher lag als bei Kindern und Jugendlichen (Incáni *et al.*, 2017). Auch bei dieser Studie war die Prävalenz von *G. intestinalis* bei Kinder und Jugendlichen dagegen viel höher als bei Erwachsenen. Somit verhält sich die Prävalenz von *G. intestinalis* im Altersverlauf genau umgekehrt zur Prävalenz von *E. dispar*. Es sollte Gegenstand zukünftiger Forschung sein, dieses Phänomen weiter zu untersuchen.

4.6 Protozoeninfektionen und WASH

Mehr als 300 Millionen Menschen in Subsahara Afrika haben einen unzureichenden Zugang zu sauberem Trinkwasser (WHO, 2014). Dies prädisponiert für Infektionen mit wasserübertragenen Pathogenen, deren wichtigster Vertreter aus der Gruppe der Protozoen *G. intestinalis* ist.

Auch Bevölkerungswachstum und wechselnde klimatische Bedingungen können durch eine Verschlechterung des Zugangs zu sauberem Trinkwasser die Übertragung durch *G. intestinalis* erleichtern (Bain *et al.*, 2013; Squire und Ryan, 2017). Zur Senkung der Prävalenz sind dagegen Trinkwasserreinigung, persönliche Hygieneverbesserung, Sanitäranlagen und Abwasseraufbereitung notwendig (Omarova *et al.*, 2018). Auch das Auftreten von Infektionen mit *E. dispar* und *E. histolytica* ist stark vom Zugang zu sauberem Wasser und Sanitäranlagen sowie von den hygienischen Verhältnissen abhängig (Choy *et al.*, 2014; Matthys *et al.*, 2011; Speich *et al.*, 2016).

Den Bewohnern von Ijinga Island stand zum Zeitpunkt der Studiendurchführung kein sauberes Trinkwasser zu Verfügung. Zum Trinken, Waschen, Kochen und allen anderen Aktivitäten des täglichen Lebens nutzen sie das Wasser des Viktoriasees. Da den meisten Menschen auch keine Latrinen zur Verfügung stehen, werden Defäkationen oft in Ufernähe verrichtet. Mit der nutritionalen Nutzung des Seewassers wird dann der Transmissionszyklus komplettiert. Durch Armut und den Mangel an Wasser in den Haushalten können vermutlich auch einfachste Hygienestandards wie beispielsweise das Händewaschen nicht eingehalten werden. Diese Punkte könnten Gründe für die hohe Prävalenz intestinaler Protozoeninfektionen auf Ijinga Island sein. Um die Zahl der Infektionen wirkungsvoll zu senken, sind daher tiefgreifende Maßnahmen erforderlich. Dies schließt einerseits die Bereitstellung von sauberem Trinkwasser ein, was zunächst durch Brunnen gewährleistet werden soll. In nächster Instanz wären dann Wasseraufbereitungs- und Filtersysteme sowie Leitungen anzudenken, welche die Haushalte mit frischem Wasser versorgen. Auch durch die Nutzung des Sonnenlichts beziehungsweise der UV-Strahlung zur Wasserdesinfektion kann auf umweltfreundlichem Wege zur Senkung der Infektionsrate intestinaler Protozoeninfektionen beigetragen werden. Zudem sind die Bereitstellung von sanitären Anlagen in Form von öffentlichen Toiletten im weiteren Verlauf des Schistosomiasis-Kontrollprojekts auf Ijinga Island geplant. Außerdem werden gesundheitsbildende Maßnahmen in Form von Veranstaltungen und Plakaten sowie Hygieneaufklärungen stattfinden. Zur Unterstützung wird dabei eine „Community Nurse“ dauerhaft auf der Insel

beschäftigt. Wichtig ist hierbei die Einbindung der Gemeinden in die Planung und Durchführung der Maßnahmen. Dass eine solche von der Gemeinde getragene Implementation von Hygieneedukation zusammen mit der Verbesserung der Sanitäranlagen zu einer signifikanten Senkung intestinaler Protozoeninfektionen führen kann, zeigen aktuelle Studien aus der Elfenbeinküste. Ein solches Konzept führt außerdem zur Senkung der Infektionsrate mit *S. mansoni* und STH (Hurlimann *et al.*, 2018; Raso *et al.*, 2018).

Die Verbesserung von WASH sollte daher oberste Priorität für das Ziel einer Senkung der Prävalenz intestinaler Parasiteninfektionen sein (Speich *et al.*, 2016, 87-99). Um den Erfolg von WASH Maßnahmen zu messen, wurden in der Vergangenheit viele Verfahren untersucht und entwickelt. Während einige auf die persönliche Kontrolle der Nutzung von Latrinen und der Einhaltung von Hygienemaßnahmen setzen, nutzen andere hierzu vorzugsweise Fragebögen (Garfi und Ferrer-Marti, 2011; Schwemlein *et al.*, 2016; WHO, 2000). In dieser Studie soll jedoch als Novum die Prävalenz Intestinaler Protozoeninfektionen als Marker für WASH Maßnahmen genutzt werden, da diese unmittelbar voneinander abhängig sind. Anhand der Entwicklung von der Basisprävalenz zur Verlaufsprävalenz soll dann der Erfolg der Maßnahmen anschaulich gemacht werden. Ähnlich wie bei einer Studie in Taabo sollen so Daten aus dieser Studie als Maßstab zum Monitoring von Hygieneedukation, Verbesserung der Sanitärstruktur und der Bereitstellung von sauberem Trinkwasser dienen (Schmidlin *et al.*, 2013).

4.7 Ausblick

Der Zusammenhang zwischen WASH und intestinalen Protozoeninfektionen scheint immer größere Aufmerksamkeit zu erlangen und mit der Festsetzung als SDG haben die Vereinten Nationen einen wichtigen Schritt zur Senkung des Infektionsgrades intestinaler Protozoeninfektionen getan. Doch die Realität 2018 ist noch weit von der Erfüllung des SDG entfernt. So haben immer noch sechs von zehn Menschen auf der Welt keinen Zugang zu adäquaten Sanitäreinrichtungen und drei von zehn Menschen haben kein sauberes Trinkwasser zur Verfügung (UN, 2018). Solange diese Umstände nicht behoben sind, wird die Prävalenz intestinaler Protozoeninfektionen, aber auch die Prävalenz von STH und vieler weiterer hygieneassoziiierter Erkrankungen unvermindert hoch bleiben oder aufgrund neuer menschengemachter Herausforderungen wie Überbevölkerung und Klimawandel sogar steigen. Deshalb ist dringend die Implementation koordinierter Maßnahmen erforderlich, die durch eine multidisziplinäre Herangehensweise den Zugang zu WASH ermöglichen und die Infektionsrate dieser Erkrankungen verringern. Ein positives Beispiel für eine solche Zusammenarbeit ist die Initiative „One Health“ (Squire und Ryan, 2017). Wichtig wird weiterhin sein, das Bewusstsein bei den Menschen für die Erkrankungen, Übertragungswege und Prävention zu schaffen. Unter Berücksichtigung eines mehrstufigen Ansatzes bei dem auch Vertreter verschiedener Interessensgruppen miteingebunden werden, kann so eine effektive Umsetzung der bisher eher theoretischen Modelle erfolgen (Freeman *et al.*, 2013).

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Stuhlproben von 357 Einwohnern der Insel Ijinga Island in Tansania auf Infektionen mit intestinalen Parasiten untersucht. Der Verfasser war schon in der Planung des SchistoControl Projektes involviert und reiste auch selbst zu Feldbegutachtungen am Studienort der vorliegenden Arbeit, um an der Studiendurchführung mitzuwirken.

Die Hauptfragestellung bezog sich dabei auf die Prävalenzerhebung der Protozoeninfektionen, im Speziellen *G. intestinalis*, *E. histolytica* und *E. dispar*.

Die Stuhlproben wurden hierzu nach SAF Fixierung und Konzentration mikroskopisch untersucht, wobei auch die Prävalenzen von STH und *S. mansoni* mit erhoben wurden. Zudem wurden die Stuhlproben nach Extraktion der DNA mittels qPCR auf *G. intestinalis*, *E. histolytica* und *E. dispar* untersucht, da sich jene in früheren Studien als sensitivstes Verfahren für deren Detektion erwiesen hat (Stark *et al.*, 2011; Verweij *et al.*, 2003b). Die mikroskopische Untersuchung ergab eine Prävalenz von 12 % (95% KI: 8,63-15,37) für *G. intestinalis* und von 26,1 % (95% KI: 21,55-30,65) für *E. histolytica/dispar*.

Die qPCR detektierte 12,0 % (95% KI: 8,63-15,37) positiv für *G. intestinalis*, 21,8 % (95% KI: 17,5-26,1) positiv für *E. dispar* und keine Probe positiv für *E. histolytica*.

Im Vergleich der Altersmittelwerte der positiven und negativen Studienteilnehmer konnte gezeigt werden, dass jüngere Individuen häufiger mit *G. intestinalis* befallen sind, wohingegen ein solcher Unterschied bei *E. dispar* nicht nachgewiesen werden konnte.

Es wurde die eingangs aufgestellte Hypothese bestätigt, nach der die Prävalenz von *E. histolytica* nach PCR Diskrimination deutlich geringer ist als die mikroskopische Prävalenz der in diesem Verfahren nicht unterscheidbaren *E. histolytica/dispar*. Auch andere Autoren wiesen mittels qPCR eine geringe *E. histolytica* Prävalenz nach und vermuten, dass die derzeit angenommene Infektionsrate weltweit überschätzt wird (Efunshile *et al.*, 2015; Kebede *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2011). Um eine solche Vermutung zu überprüfen, sind

allerdings weitere Prävalenzerhebungen notwendig, da es aus zahlreichen Regionen noch keine oder nur unzureichende Daten gibt.

Die Prävalenzdaten der hier ermittelten intestinalen Protozoeninfektionen auf Ijinga Island werden als Basisdaten zukünftigen WASH Maßnahmen im Sinne eines Ausgangsparameters dienlich sein. Nach Durchführung solcher Maßnahmen muss eine weitere Erhebung mit gleicher Methodik und gleichem Studienkollektiv erfolgen, um das Ergebnis messbar machen zu können. Ein Erfolg der WASH Interventionen kann auf andere Regionen übertragen werden und zur signifikanten Senkung intestinaler Protozoeninfektionen, aber auch Infektionen mit STH, *Schistosomiasis* und anderer Infektionskrankheiten beitragen. Auf globale Ebene übertragen, könnten dadurch hunderttausende Infektionen und auch Todesfälle vermieden werden.

6 Literaturverzeichnis

Abbaszadeh Afshar, M. J., Barkhori Mehni, M., Rezaeian, M., Mohebali, M., Baigi, V., Amiri, S., Amirshakari, M. B., Hamidinia, R. und Samimi, M. (2020). **Prevalence and associated risk factors of human intestinal parasitic infections: a population-based study in the southeast of Kerman province, southeastern Iran.** BMC Infect Dis 20, 12, doi: 10.1186/s12879-019-4730-8.

Abdel-Hafeez, E. H., Mohamed, R. M., Belal, U. S., Abdel-Raheem, E. M., Naoi, K. und Norose, K. (2015). **Polymerase Chain Reaction: A Better Method for Diagnosing Chronic Schistosoma mansoni Infections.** Trop Med Health 43, 205-209, doi: 10.2149/tmh.2015-22.

Al-Mekhlafi, H. M. (2017). **Giardia duodenalis infection among rural communities in Yemen: A community-based assessment of the prevalence and associated risk factors.** Asian Pac J Trop Med 10, 987-995, doi: 10.1016/j.apjtm.2017.09.011.

Alam, F., Salam, M. A., Hassan, P., Mahmood, I., Kabir, M. und Haque, R. (2014). **Amebic liver abscess in northern region of Bangladesh: sociodemographic determinants and clinical outcomes.** BMC Res Notes 7, 625, doi: 10.1186/1756-0500-7-625.

Amin, O. M. (2002). **Seasonal prevalence of intestinal parasites in the United States during 2000.** Am J Trop Med Hyg 66, 799-803.

Bain, L. E., Awah, P. K., Geraldine, N., Kindong, N. P., Sigal, Y., Bernard, N. und Tanjeko, A. T. (2013). **Malnutrition in Sub-Saharan Africa: burden, causes and prospects.** Pan Afr Med J 15, 120, doi: 10.11604/pamj.2013.15.120.2535.

Barbosa, C. S., Gomes, E. C. S., Marcelino, J. M. R., Cavalcante, K. R. L. J. und Nascimento, W. R. C. (2017). **Quality control of the slides by Kato-Katz method for the parasitological diagnosis of schistosomiasis infection by Schistosoma mansoni.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial 53, 110-114.

Barenbold, O., Raso, G., Coulibaly, J. T., N'Goran, E. K., Utzinger, J. und Vounatsou, P. (2017). **Estimating sensitivity of the Kato-Katz technique for the diagnosis of Schistosoma mansoni and hookworm in relation to infection intensity.** PLoS Negl Trop Dis 11, e0005953, doi: 10.1371/journal.pntd.0005953.

Benere, E., Van Assche, T., Van Ginneken, C., Peulen, O., Cos, P. und Maes, L. (2012). **Intestinal growth and pathology of Giardia duodenalis assemblage subtype A(I), A(II), B and E in the gerbil model.** Parasitology 139, 424-433, doi: 10.1017/s0031182011002137.

Betancourt, W. Q. und Rose, J. B. (2004 Dec 9). **Drinking water treatment processes for removal of Cryptosporidium and Giardia**. *Vet Parasitol.* 126(1-2), 219-234.

Beyhan, Y. E. und Tas Cengiz, Z. (2017). **Comparison of microscopy, ELISA, and real-time PCR for detection of Giardia intestinalis in human stool specimens**. *Turk J Med Sci* 47, 1295-1299, doi: 10.3906/sag-1612-71.

Britten, D., Wilson, S. M., McNerney, R., Moody, A. H., Chiodini, P. L. und Ackers, J. P. (1997). **An improved colorimetric PCR-based method for detection and differentiation of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar in feces**. *J Clin Microbiol* 35, 1108-1111.

C.I.A. (2018). **The World Factbook: TANZANIA** URL: www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/tz.html. [Stand:26 Sept. 2018].

Calegar, D. A., Nunes, B. C., Monteiro, K. J., Santos, J. P., Toma, H. K., Gomes, T. F., Lima, M. M., Boia, M. N. und Carvalho-Costa, F. A. (2016). **Frequency and molecular characterisation of Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar, Entamoeba moshkovskii, and Entamoeba hartmanni in the context of water scarcity in northeastern Brazil**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 111, 114-119, doi: 10.1590/0074-02760150383.

Casacuberta, M., Kinunghi, S., Vennervald, B. J. und Olsen, A. (2016). **Evaluation and optimization of the Circulating Cathodic Antigen (POC-CCA) cassette test for detecting Schistosoma mansoni infection by using image analysis in school children in Mwanza Region, Tanzania**. *Parasite Epidemiol Control.* 1(2), 105-115.

Chin, A. C., Teoh, D. A., Scott, K. G., Meddings, J. B., Macnaughton, W. K. und Buret, A. G. (2002). **Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by Giardia lamblia disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner**. *Infect Immun* 70, 3673-3680.

Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A. und Savioli, L. (2000). **The global status of schistosomiasis and its control**. *Acta Trop* 77, 41-51.

Choy, S. H., Al-Mekhlafi, H. M., Mahdy, M. A., Nasr, N. N., Sulaiman, M., Lim, Y. A. und Surin, J. (2014). **Prevalence and associated risk factors of Giardia infection among indigenous communities in rural Malaysia**. *Sci Rep* 4, 6909, doi: 10.1038/srep06909.

Cifuentes, E., Suarez, L., Espinosa, M., Juarez-Figueroa, L. und Martinez-Palomo, A. (2004). **Risk of Giardia intestinalis infection in children from an artificially recharged groundwater area in Mexico City**. *Am J Trop Med Hyg* 71, 65-70.

- Claassen, S., du Toit, E., Kaba, M., Moodley, C., Zar, H. J. und Nicol, M. P. (2013). **A comparison of the efficiency of five different commercial DNA extraction kits for extraction of DNA from faecal samples**. J Microbiol Methods 94, 103-110, doi: 10.1016/j.mimet.2013.05.008.
- Clark, C. G. (1998). **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene meeting at Manson House, London, 19 February 1998. Amoebic disease. Entamoeba dispar, an organism reborn**. Trans R Soc Trop Med Hyg 92, 361-364.
- Coulibaly, G., Ouattara, M., Dongo, K., Hurlimann, E., Bassa, F. K., Kone, N., Esse, C., Yapi, R. B., Bonfoh, B., Utzinger, J., Raso, G. und N'Goran, E. K. (2018). **Epidemiology of intestinal parasite infections in three departments of south-central Cote d'Ivoire before the implementation of a cluster-randomised trial**. Parasite Epidemiol Control 3, 63-76, doi: 10.1016/j.parepi.2018.02.003.
- Curtis, V. und Cairncross, S. (2003). **Effect of washing hands with soap on diarrhoea risk in the community: a systematic review**. Lancet Infect Dis 3, 275-281.
- ECDC (2016). **European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Report 2016 - Giardiasis. Stockholm**.
- Efunshile, M. A., Ngwu, B. A., Kurtzhals, J. A., Sahar, S., Konig, B. und Stensvold, C. R. (2015). **Molecular Detection of the Carriage Rate of Four Intestinal Protozoa with Real-Time Polymerase Chain Reaction: Possible Overdiagnosis of Entamoeba histolytica in Nigeria**. Am J Trop Med Hyg 93, 257-262, doi: 10.4269/ajtmh.14-0781.
- ElBakri, A., Samie, A., Ezzedine, S. und Odeh, R. A. (2013). **Differential detection of Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar and Entamoeba moshkovskii in fecal samples by nested PCR in the United Arab Emirates (UAE)**. Acta Parasitol 58, 185-190, doi: 10.2478/s11686-013-0128-8.
- Ericsson, C. D., Steffen, R., Siddiqui, A. A. und Berk, S. L. (2001). **Diagnosis of Strongyloides stercoralis Infection**. Clinical Infectious Diseases 33, 1040-1047, doi: 10.1086/322707.
- Espinosa-Cantellano, M. und Martinez-Palomo, A. (2000). **Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease**. Clin Microbiol Rev 13, 318-331.
- Feng, Y. und Xiao, L. (2011). **Zoonotic potential and molecular epidemiology of Giardia species and giardiasis**. Clin Microbiol Rev 24, 110-140, doi: 10.1128/cmr.00033-10.

Forsell, J., Granlund, M., Samuelsson, L., Koskiniemi, S., Edebro, H. und Evengard, B. (2016). **High occurrence of Blastocystis sp. subtypes 1-3 and Giardia intestinalis assemblage B among patients in Zanzibar, Tanzania.** Parasit Vectors 9, 370, doi: 10.1186/s13071-016-1637-8.

Förster, T. (1948). **Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz.** Annalen der Physik 437, 55-75, doi: doi:10.1002/andp.19484370105.

Freeman, M. C., Ogden, S., Jacobson, J., Abbott, D., Addiss, D. G., Amnie, A. G., Beckwith, C., Cairncross, S., Callejas, R., Colford, J. M., Jr., Emerson, P. M., Fenwick, A., Fishman, R., Gallo, K., Grimes, J., Karapetyan, G., Keene, B., Lammie, P. J., Macarthur, C., Lochery, P., Petach, H., Platt, J., Prabasi, S., Rosenboom, J. W., Roy, S., Saywell, D., Schechtman, L., Tantri, A., Velleman, Y. und Utzinger, J. (2013). **Integration of water, sanitation, and hygiene for the prevention and control of neglected tropical diseases: a rationale for inter-sectoral collaboration.** PLoS Negl Trop Dis 7, e2439, doi: 10.1371/journal.pntd.0002439.

Fuss, A., Mazigo, H. D., Tappe, D., Kasang, C. und Mueller, A. (2018). **Comparison of sensitivity and specificity of three diagnostic tests to detect Schistosoma mansoni infections in school children in Mwanza region, Tanzania.** PLoS One 13, e0202499, doi: 10.1371/journal.pone.0202499.

Gadgil, A. (1998). **DRINKING WATER IN DEVELOPING COUNTRIES.** Annual Review of Energy and the Environment 23, 253-286, doi: 10.1146/annurev.energy.23.1.253.

Gardner, T. B. und Hill, D. R. (2001). **Treatment of giardiasis.** Clin Microbiol Rev 14, 114-128, doi: 10.1128/cmr.14.1.114-128.2001.

Garfi, M. und Ferrer-Marti, L. (2011). **Decision-making criteria and indicators for water and sanitation projects in developing countries.** Water Sci Technol 64, 83-101.

Gonzales, M. L. M., Dans, L. F. und Sio-Aguilar, J. (2019). **Antiamoebic drugs for treating amoebic colitis.** Cochrane Database Syst Rev 1, Cd006085, doi: 10.1002/14651858.CD006085.pub3.

Gotfred-Rasmussen, H., Lund, M., Enemark, H. L., Erlandsen, M. und Petersen, E. (2016). **Comparison of sensitivity and specificity of 4 methods for detection of Giardia duodenalis in feces: immunofluorescence and PCR are superior to microscopy of concentrated iodine-stained samples.** Diagn Microbiol Infect Dis 84, 187-190, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.11.005.

Gupta, S. S., Singh, O., Shukla, S. und Raj, M. K. (2009). **Acute fulminant necrotizing amoebic colitis: a rare and fatal complication of amoebiasis: a case report.** *Cases J* 2, 6557, doi: 10.4076/1757-1626-2-6557.

Harries, J. (1982). **Amoebiasis: a review.** *J R Soc Med* 75, 190-197.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. und Williams, P. M. (1996). **Real time quantitative PCR.** *Genome Res* 6, 986-994.

Hemmati, N., Razmjou, E., Hashemi-Hafshejani, S., Motevalian, A., Akhlaghi, L. und Meamar, A. R. (2017). **Prevalence and Risk Factors of Human Intestinal Parasites in Roudehen, Tehran Province, Iran.** *Iran J Parasitol* 12, 364-373.

Hernandez, E. G., Granados, J., Partida-Rodriguez, O., Valenzuela, O., Rascon, E., Magana, U., Escamilla-Tilch, M., Lopez-Reyes, A., Nieves-Ramirez, M., Gonzalez, E., Moran, P., Rojas, L., Valadez, A., Luna, A., Estrada, F. J., Maldonado, C. und Ximenez, C. (2015). **Prevalent HLA Class II Alleles in Mexico City Appear to Confer Resistance to the Development of Amebic Liver Abscess.** *PLoS One* 10, e0126195, doi: 10.1371/journal.pone.0126195.

Heydari-Hengami, M., Hamedi, Y., Najafi-Asl, M. und Sharifi-Sarasiabi, K. (2018). **Prevalence of Intestinal Parasites in Food Handlers of Bandar Abbas, Southern Iran.** *Iran J Public Health*, 47(1): 111–118.

Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. und Gelfand, D. H. (1991). **Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7276-7280.

Hotez, P. J., Bundy, D. A. P., Beegle, K., Brooker, S., Drake, L., de Silva, N., Montresor, A., Engels, D., Jukes, M., Chitsulo, L., Chow, J., Laxminarayan, R., Michaud, C., Bethony, J., Correa-Oliveira, R., Shuhua, X., Fenwick, A. und Savioli, L. (2006). **Helminth Infections: Soil-transmitted Helminth Infections and Schistosomiasis.** In: *Disease Control Priorities in Developing Countries*, Hrsg. nd, Jamison, D. T., Breman, J. G., et al., World Bank The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank Group., Washington (DC).

Hurlimann, E., Silue, K. D., Zouzou, F., Ouattara, M., Schmidlin, T., Yapi, R. B., Hounbedji, C. A., Dongo, K., Kouadio, B. A., Kone, S., Bonfoh, B., N'Goran, E. K., Utzinger, J., Acka-Douabele, C. A. und Raso, G. (2018). **Effect of an integrated intervention package of preventive chemotherapy, community-led total sanitation and health education on the prevalence of helminth and intestinal protozoa infections in Cote d'Ivoire.** *Parasit Vectors* 11, 115, doi: 10.1186/s13071-018-2642-x.

Incani, R. N., Ferrer, E., Hoek, D., Ramak, R., Roelfsema, J., Mughini-Gras, L., Kortbeek, T. und Pinelli, E. (2017). **Diagnosis of intestinal parasites in a rural**

community of Venezuela: Advantages and disadvantages of using microscopy or RT-PCR. *Acta Tropica* 167, 64-70, doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.12.014>.

Johnston, A. R., Gillespie, T. R., Rwego, I. B., McLachlan, T. L., Kent, A. D. und Goldberg, T. L. (2010). **Molecular epidemiology of cross-species *Giardia duodenalis* transmission in western Uganda.** *PLoS Negl Trop Dis* 4, e683, doi: 10.1371/journal.pntd.0000683.

Kaatano, G. M., Siza, J. E., Mwanga, J. R., Min, D. Y., Yong, T. S., Chai, J. Y., Ko, Y., Chang, S. Y., Kullaya, C. M., Rim, H. J., Chungalucha, J. M. und Eom, K. S. (2015). **Integrated Schistosomiasis and Soil-Transmitted Helminthiasis Control over Five Years on Kome Island, Tanzania.** *Korean J Parasitol* 53, 535-543, doi: 10.3347/kjp.2015.53.5.535.

Kannathasan, S., Murugananthan, A., Kumanan, T., de Silva, N. R., Rajeshkannan, N., Haque, R. und Iddawela, D. (2018). **Epidemiology and factors associated with amoebic liver abscess in northern Sri Lanka.** *BMC Public Health* 18, 118, doi: 10.1186/s12889-018-5036-2.

Katz, N., Chaves, A. und Pellegrino, J. (1972). **A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 14, 397-400.

Kebede, A., Verweij, J. J., Endeshaw, T., Messele, T., Tasew, G., Petros, B. und Polderman, A. M. (2004). **The use of real-time PCR to identify *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* infections in prisoners and primary-school children in Ethiopia.** *Ann Trop Med Parasitol* 98, 43-48, doi: 10.1179/000349804225003082.

Khademvatan, S., Masjedizadeh, R., Rahim, F., Mahbodfar, H., Salehi, R., Yousefi-Razin, E. und Foroutan, M. (2017). **Blastocystis and irritable bowel syndrome: Frequency and subtypes from Iranian patients.** *Parasitol Int* 66, 142-145, doi: 10.1016/j.parint.2017.01.005.

Knopp, S., Salim, N., Schindler, T., Karagiannis Voules, D. A., Rothen, J., Lweno, O., Mohammed, A. S., Singo, R., Benninghoff, M., Nsojo, A. A., Genton, B. und Daubenberger, C. (2014). **Diagnostic accuracy of Kato-Katz, FLOTAC, Baermann, and PCR methods for the detection of light-intensity hookworm and *Strongyloides stercoralis* infections in Tanzania.** *Am J Trop Med Hyg* 90, 535-545, doi: 10.4269/ajtmh.13-0268.

Lee, L. G., Connell, C. R. und Bloch, W. (1993). **Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes.** *Nucleic Acids Res* 21, 3761-3766.

Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W. und Deetz, K. (1995). **Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a**

quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4, 357-362.

Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S. Y., Alvarado, M., Anderson, H. R., Anderson, L. M., Andrews, K. G., Atkinson, C., Baddour, L. M., Barker-Collo, S., Bartels, D. H., Bell, M. L., Benjamin, E. J., Bennett, D., Bhalla, K., Bikbov, B., Bin Abdulhak, A., Birbeck, G., Blyth, F., Bolliger, I., Boufous, S., Bucello, C., Burch, M., Burney, P., Carapetis, J., Chen, H., Chou, D., Chugh, S. S., Coffeng, L. E., Colan, S. D., Colquhoun, S., Colson, K. E., Condon, J., Connor, M. D., Cooper, L. T., Corriere, M., Cortinovis, M., de Vaccaro, K. C., Couser, W., Cowie, B. C., Criqui, M. H., Cross, M., Dabhadkar, K. C., Dahodwala, N., De Leo, D., Degenhardt, L., Delossantos, A., Denenberg, J., Des Jarlais, D. C., Dharmaratne, S. D., Dorsey, E. R., Driscoll, T., Duber, H., Ebel, B., Erwin, P. J., Espindola, P., Ezzati, M., Feigin, V., Flaxman, A. D., Forouzanfar, M. H., Fowkes, F. G., Franklin, R., Fransen, M., Freeman, M. K., Gabriel, S. E., Gakidou, E., Gaspari, F., Gillum, R. F., Gonzalez-Medina, D., Halasa, Y. A., Haring, D., Harrison, J. E., Havmoeller, R., Hay, R. J., Hoen, B., Hotez, P. J., Hoy, D., Jacobsen, K. H., James, S. L., Jasrasaria, R., Jayaraman, S., Johns, N., Karthikeyan, G., Kassebaum, N., Keren, A., Khoo, J. P., Knowlton, L. M., Kobusingye, O., Koranteng, A., Krishnamurthi, R., Lipnick, M., Lipshultz, S. E., Ohno, S. L., Mabweijano, J., MacIntyre, M. F., Mallinger, L., March, L., Marks, G. B., Marks, R., Matsumori, A., Matzopoulos, R., Mayosi, B. M., McAnulty, J. H., McDermott, M. M., McGrath, J., Mensah, G. A., Merriman, T. R., Michaud, C., Miller, M., Miller, T. R., Mock, C., Mocumbi, A. O., Mokdad, A. A., Moran, A., Mulholland, K., Nair, M. N., Naldi, L., Narayan, K. M., Nasser, K., Norman, P., O'Donnell, M., Omer, S. B., Ortblad, K., Osborne, R., Ozgediz, D., Pahari, B., Pandian, J. D., Rivero, A. P., Padilla, R. P., Perez-Ruiz, F., Perico, N., Phillips, D., Pierce, K., Pope, C. A., 3rd, Porrini, E., Pourmalek, F., Raju, M., Ranganathan, D., Rehm, J. T., Rein, D. B., Remuzzi, G., Rivara, F. P., Roberts, T., De Leon, F. R., Rosenfeld, L. C., Rushton, L., Sacco, R. L., Salomon, J. A., Sampson, U., Sanman, E., Schwebel, D. C., Segui-Gomez, M., Shepard, D. S., Singh, D., Singleton, J., Sliwa, K., Smith, E., Steer, A., Taylor, J. A., Thomas, B., Tleyjeh, I. M., Towbin, J. A., Truelsen, T., Undurraga, E. A., Venketasubramanian, N., Vijayakumar, L., Vos, T., Wagner, G. R., Wang, M., Wang, W., Watt, K., Weinstock, M. A., Weintraub, R., Wilkinson, J. D., Woolf, A. D., Wulf, S., Yeh, P. H., Yip, P., Zabetian, A., Zheng, Z. J., Lopez, A. D., Murray, C. J., AlMazroa, M. A. und Memish, Z. A. (2012). **Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010.** *Lancet* 380, 2095-2128, doi: 10.1016/S0140-6736(12)61728-0.

Lubbert, C., Wiegand, J. und Karlas, T. (2014). **Therapy of Liver Abscesses.** *Viszeralmedizin* 30, 334-341, doi: 10.1159/000366579.

Maes, R. K., Langohr, I. M., Wise, A. G., Smedley, R. C., Thaiwong, T. und Kiupel, M. (2014). **Beyond H&E: integration of nucleic acid-based analyses**

into diagnostic pathology. *Vet Pathol* 51, 238-256, doi: 10.1177/0300985813505878.

Matthys, B., Bobieva, M., Karimova, G., Mengliboeva, Z., Jean-Richard, V., Hoimnazarova, M., Kurbonova, M., Lohourignon, L. K., Utzinger, J. und Wyss, K. (2011). **Prevalence and risk factors of helminths and intestinal protozoa infections among children from primary schools in western Tajikistan.** *Parasit Vectors* 4, 195, doi: 10.1186/1756-3305-4-195.

Mazigo, H., Ambrose, E., Zinga, M., Bahemana, E., Mnyone, L., Kweka, E. und Heukelbach, J. (2010). **Prevalence of intestinal parasitic infections among patients attending Bugando Medical Centre in Mwanza, north-western Tanzania: a retrospective study.** *Tanzania Journal of Health Research*, 12(3), 178-182, doi: 10.4314/thrb.v12i3.54205.

Mazigo, H. D., Kepha, S. und Kinung'hi, S. M. (2018). **Sensitivity and specificity of point-of-care circulating Cathodic antigen test before and after praziquantel treatment in diagnosing Schistosoma mansoni infection in adult population co-infected with human immunodeficiency virus-1, North-Western Tanzania.** *Arch Public Health* 76, 29, doi: 10.1186/s13690-018-0274-4.

Mazigo, H. D., Nuwaha, F., Kinung'hi, S. M., Morona, D., Pinot de Moira, A., Wilson, S., Heukelbach, J. und Dunne, D. W. (2012). **Epidemiology and control of human schistosomiasis in Tanzania.** *Parasit Vectors* 5, 274, doi: 10.1186/1756-3305-5-274.

Mbuh, J. V., Ntonifor, H. N. und Ojong, J. T. (2009). **The incidence, intensity and host morbidity of human parasitic protozoan infections in gastrointestinal disorder outpatients in Buea Sub Division, Cameroon.** *J Infect Dev Ctries* 4, 38-43.

Menzies, S. K., Rodriguez, A., Chico, M., Sandoval, C., Broncano, N., Guadalupe, I. und Cooper, P. J. (2014). **Risk factors for soil-transmitted helminth infections during the first 3 years of life in the tropics; findings from a birth cohort.** *PLoS Negl Trop Dis* 8, e2718, doi: 10.1371/journal.pntd.0002718.

Mims, C. A., Ackermann, G. und Rempe-Baldin, W. (2006). **Medizinische Mikrobiologie, Infektiologie,** Elsevier, Urban und Fischer.

Mueller, A., Fuss, A., Ziegler, U., Kaatano, G. M. und Mazigo, H. D. (2019). **Intestinal schistosomiasis of Ijinga Island, north-western Tanzania: prevalence, intensity of infection, hepatosplenic morbidities and their associated factors.** *BMC Infectious Diseases* 19, 832, doi: 10.1186/s12879-019-4451-z.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction**. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51 Pt 1, 263-273.
- Nath, J., Ghosh, S. K., Singha, B. und Paul, J. (2015). **Molecular Epidemiology of Amoebiasis: A Cross-Sectional Study among North East Indian Population**. PLOS Neglected Tropical Diseases 9, e0004225, doi: 10.1371/journal.pntd.0004225.
- Ngui, R., Angal, L., Fakhrurrazi, S. A., Lian, Y. L., Ling, L. Y., Ibrahim, J. und Mahmud, R. (2012). **Differentiating Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar and Entamoeba moshkovskii using nested polymerase chain reaction (PCR) in rural communities in Malaysia**. Parasit Vectors 5, 187, doi: 10.1186/1756-3305-5-187.
- Noor Azian, M. Y., San Ym Fau - Gan, C. C., Gan Cc Fau - Yusri, M. Y., Yusri My Fau - Nurulsyamzawaty, Y., Nurulsyamzawaty Y Fau - Zuhaizam, A. H., Zuhaizam Ah Fau - Maslawaty, M. N., Maslawaty Mn Fau - Norparina, I., Norparina I Fau - Vythilingam, I. und Vythilingam, I. (2007 Jun). **Prevalence of intestinal protozoa in an aborigine community in Pahang, Malaysia**. Trop Biomed. 24(1), 55-62.
- Okoyo, C., Simiyu, E., Njenga, S. M. und Mwandawiro, C. (2018). **Comparing the performance of circulating cathodic antigen and Kato-Katz techniques in evaluating Schistosoma mansoni infection in areas with low prevalence in selected counties of Kenya: a cross-sectional study**. BMC Public Health 18, 478, doi: 10.1186/s12889-018-5414-9.
- Omarova, A., Tussupova, K., Berndtsson, R., Kalishev, M. und Sharapatova, K. (2018). **Protozoan Parasites in Drinking Water: A System Approach for Improved Water, Sanitation and Hygiene in Developing Countries**. Int J Environ Res Public Health 15, doi: 10.3390/ijerph15030495.
- Oyibo, A., Anthonia, Ike, A., Oladipo, O., Oladosu, O., Ojuromi, O., Ojuromi, O., Sanyaolu, A., Olusanya, O., Adetayo und Fagbenro-Beyioku, F. (2013). **Prevalence of Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar among patients with gastrointestinal complaints in Lagos, Nigeria**. American Journal of Clinical Pathology 138, 10-19.
- Parija, S. C., Chidambaram, M. und Mandal, J. (2017). **Epidemiology and clinical features of soil-transmitted helminths**. Trop Parasitol 7, 81-85, doi: 10.4103/tp.TP_27_17.
- Plutzer, J., Ongerth, J. und Karanis, P. (2010). **Giardia taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions**. Int J Hyg Environ Health 213, 321-333, doi: 10.1016/j.ijheh.2010.06.005.

Qiagen (2011). **QuantiFast Pathogen PCR + IC Handbook** URL: <https://www.qiagen.com/ie/resources/resourcedetail?id=0707eb32-fabc-4843-938a-65dc253e8b30&lang=en> [Stand:2019].

Quach, J., St-Pierre, J. und Chadee, K. (2014). **The future for vaccine development against *Entamoeba histolytica***. *Hum Vaccin Immunother* 10, 1514-1521, doi: 10.4161/hv.27796.

Raso, G., Esse, C., Dongo, K., Ouattara, M., Zouzou, F., Hurlimann, E., Koffi, V. A., Coulibaly, G., Mahan, V., Yapi, R. B., Kone, S., Coulibaly, J. T., Meite, A., Guehi-Kabran, M. C., Bonfoh, B., N'Goran, E. K. und Utzinger, J. (2018). **An Integrated Approach to Control Soil-Transmitted Helminthiasis, Schistosomiasis, Intestinal Protozoa Infection, and Diarrhea: Protocol for a Cluster Randomized Trial**. *JMIR Res Protoc* 7, e145, doi: 10.2196/resprot.9166.

Riess, H., Clowes, P., Kroidl, I., Kowuor, D. O., Nsojo, A., Mangu, C., Schule, S. A., Mansmann, U., Geldmacher, C., Mhina, S., Maboko, L., Hoelscher, M. und Saathoff, E. (2013). **Hookworm infection and environmental factors in mbeya region, Tanzania: a cross-sectional, population-based study**. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2408, doi: 10.1371/journal.pntd.0002408.

Rollinson, D., Knopp, S., Levitz, S., Stothard, J. R., Tchuem Tchuente, L. A., Garba, A., Mohammed, K. A., Schur, N., Person, B., Colley, D. G. und Utzinger, J. (2013). **Time to set the agenda for schistosomiasis elimination**. *Acta Trop* 128, 423-440, doi: 10.1016/j.actatropica.2012.04.013.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase**. *Science* 239, 487-491.

Santos, F. L., Goncalves Mde, S. und Soares, N. M. (2011). **Validation and utilization of PCR for differential diagnosis and prevalence determination of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* in Salvador City, Brazil**. *Braz J Infect Dis* 15, 119-125.

Sarkari, B., Hosseini, G., Motazedian, M. H., Fararouei, M. und Moshfe, A. (2016). **Prevalence and risk factors of intestinal protozoan infections: a population-based study in rural areas of Boyer-Ahmad district, Southwestern Iran**. *BMC Infect Dis* 16, 703, doi: 10.1186/s12879-016-2047-4.

Savioli, L., Smith, H. und Thompson, A. (2006). **Giardia and Cryptosporidium join the 'Neglected Diseases Initiative'**. *Trends Parasitol* 22, 203-208, doi: 10.1016/j.pt.2006.02.015.

Schmidlin, T., Hürlimann, E., Silué, K. D., Yapi, R. B., Houngbedji, C., Kouadio, B. A., Acka-Douabélé, C. A., Kouassi, D., Ouattara, M., Zouzou, F., Bonfoh, B.,

N'Goran, E. K., Utzinger, J. und Raso, G. (2013). **Effects of Hygiene and Defecation Behavior on Helminths and Intestinal Protozoa Infections in Taabo, Côte d'Ivoire**. PLOS ONE 8, e65722, doi: 10.1371/journal.pone.0065722.

Schwemlein, S., Cronk, R. und Bartram, J. (2016). **Indicators for Monitoring Water, Sanitation, and Hygiene: A Systematic Review of Indicator Selection Methods**. Int J Environ Res Public Health 13, doi: 10.3390/ijerph13030333.

Segui, R., Klisiowicz, D., Oishi, C. Y., Toledo, R., Esteban, J. G. und Munoz-Antoli, C. (2017). **Intestinal symptoms and Blastocystis load in schoolchildren of Paranagua Bay, Parana, Brazil**. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 59, e86, doi: 10.1590/s1678-9946201759086.

Segui, R., Munoz-Antoli, C., Klisiowicz, D. R., Oishi, C. Y., Koster, P. C., de Lucio, A., Hernandez-de-Mingo, M., Puente, P., Toledo, R., Esteban, J. G. und Carmena, D. (2018). **Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of Giardia duodenalis and Blastocystis sp., in the Paranagua Bay, Brazil: a community survey**. Parasit Vectors 11, 490, doi: 10.1186/s13071-018-3054-7.

Shahdoust, S., Niyiyati, M., Haghighi, A., Azargashb, E. und Khataminejad, M. R. (2016). **Prevalence of intestinal parasites in referred individuals to the medical centers of Tonekabon city, Mazandaran province**. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 9, S75-s79.

Siqueira, L. M., Couto, F. F., Taboada, D., Oliveira, A. A., Carneiro, N. F., Oliveira, E., Coelho, P. M. und Katz, N. (2016). **Performance of POC-CCA(R) in diagnosis of schistosomiasis mansoni in individuals with low parasite burden**. Rev Soc Bras Med Trop 49, 341-347, doi: 10.1590/0037-8682-0070-2016.

Siza, J. E., Kaatano, G. M., Chai, J. Y., Eom, K. S., Rim, H. J., Yong, T. S., Min, D. Y., Chang, S. Y., Ko, Y. und Chungalucha, J. M. (2015). **Prevalence of Schistosomes and Soil-Transmitted Helminths among Schoolchildren in Lake Victoria Basin, Tanzania**. Korean J Parasitol 53, 515-524, doi: 10.3347/kjp.2015.53.5.515.

Solaymani-Mohammadi, S. und Singer, S. M. (2010 Nov). **Giardia duodenalis: the double-edged sword of immune responses in giardiasis**. Exp Parasitol. 126(3) 292-7, doi: 10.1016/j.exppara.2010.06.014.

Speich, B., Croll, D., Furst, T., Utzinger, J. und Keiser, J. (2016). **Effect of sanitation and water treatment on intestinal protozoa infection: a systematic review and meta-analysis**. Lancet Infect Dis 16, 87-99, doi: 10.1016/s1473-3099(15)00349-7.

Speich, B., Marti, H., Ame, S. M., Ali, S. M., Bogoch, II, Utzinger, J., Albonico, M. und Keiser, J. (2013). **Prevalence of intestinal protozoa infection among school-aged children on Pemba Island, Tanzania, and effect of single-dose albendazole, nitazoxanide and albendazole-nitazoxanide.** *Parasit Vectors* 6, 3, doi: 10.1186/1756-3305-6-3.

Squire, S. A. und Ryan, U. (2017). **Cryptosporidium and Giardia in Africa: current and future challenges.** *Parasit Vectors* 10, 195, doi: 10.1186/s13071-017-2111-y.

Stanley, S. L., Jr. (2003). **Amoebiasis.** *Lancet* 361, 1025-1034, doi: 10.1016/S0140-6736(03)12830-9.

Stark, D., Al-Qassab, S. E., Barratt, J. L., Stanley, K., Roberts, T., Marriott, D., Harkness, J. und Ellis, J. T. (2011). **Evaluation of multiplex tandem real-time PCR for detection of Cryptosporidium spp., Dientamoeba fragilis, Entamoeba histolytica, and Giardia intestinalis in clinical stool samples.** *J Clin Microbiol* 49, 257-262, doi: 10.1128/jcm.01796-10.

Suerbaum, S., Burchard, G. D., Kaufmann, S. H. E. und Schulz, T. F. (2016). **Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie,** Springer Berlin Heidelberg.

Tasawar, Z., Kausar S Fau - Lashari, M. H. und Lashari, M. H. (2010). **Prevalence of Entamoeba histolytica in humans.** *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 23(3):344-8.

Tellevik, M. G., Moyo, S. J., Blomberg, B., Hjollo, T., Maselle, S. Y., Langeland, N. und Hanevik, K. (2015). **Prevalence of Cryptosporidium parvum/hominis, Entamoeba histolytica and Giardia lamblia among Young Children with and without Diarrhea in Dar es Salaam, Tanzania.** *PLoS Negl Trop Dis* 9, e0004125, doi: 10.1371/journal.pntd.0004125.

Udkow, M. P. und Markell, E. K. (1993). **Blastocystis hominis: prevalence in asymptomatic versus symptomatic hosts.** *J Infect Dis* 168, 242-244.

UN (2018). **The Sustainable Development Goals Report 2018,** Nations, U., Hrsg. (New York).

van Dam, G. J., Wichers, J. H., Ferreira, T. M., Ghati, D., van Amerongen, A. und Deelder, A. M. (2004). **Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen.** *J Clin Microbiol* 42, 5458-5461, doi: 10.1128/jcm.42.12.5458-5461.2004.

Verweij, J. J., Oostvogel, F., Brienen, E. A., Nang-Beifubah, A., Ziem, J. und Polderman, A. M. (2003a). **Short communication: Prevalence of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar in northern Ghana.** *Trop Med Int Health* 8, 1153-1156.

Verweij, J. J., Schinkel, J., Laeijendecker, D., van Rooyen, M. A., van Lieshout, L. und Polderman, A. M. (2003b). **Real-time PCR for the detection of Giardia lamblia**. *Mol Cell Probes* 17, 223-225.

Votruba, N. und Thornicroft, G. (2016). **Sustainable development goals and mental health: learnings from the contribution of the FundaMentalSDG global initiative**. *Glob Ment Health (Camb)* 3, e26, doi: 10.1017/gmh.2016.20.

Walana, W. (2014 Jan). **Prevalence of intestinal protozoan infestation among primary school children in Urban and peri-urban communities in Kumasi, Ghana**. *Science Journal of Public Health* 2, 52-57, doi: 10.11648/j.sjph.20140202.12.

Wanke, C., Butler, T. und Islam, M. (1988). **Epidemiologic and clinical features of invasive amebiasis in Bangladesh: a case-control comparison with other diarrheal diseases and postmortem findings**. *Am J Trop Med Hyg* 38, 335-341.

WHO (1994). **Bench Aids for the diagnosis of intestinal parasites**. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/37323>, 23.

WHO (1996). **The world health report 1996 - Fighting disease, fostering development**. *World Health Forum* 18, 38.

WHO (1997). **Amoebiasis**. *Wkly Epidemiol Rec* 72, 97-99.

WHO (2000). **Tools for assessing the O&M status of water supply and sanitation in developing countries** (World Health Organization, Geneva, Switzerland).

WHO (2008). **Action Against Worms**. Issue 10, Newsletter.

WHO (2012). **Soil-Transmitted Helminthiasis: Eliminating as Public Health Problem Soil-Transmitted Helminthiasis in Children: Progress Report 2001-2010 and Strategic Plan 2011-2020** (Geneva: World Health Organization).

WHO (2014). **World Health Statistics**. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112738/1/9789240692671_eng.pdf
Accessed 25 Sept 2016.

Yang, J. und Scholten, T. (1977). **A fixative for intestinal parasites permitting the use of concentration and permanent staining procedures**. *Am J Clin Pathol* 67, 300-304.

Annex I: Addendum

Addendum to the proposal “Proof of concept study on sustainable schistosomiasis elimination through an integrated community based approach in Ijinga Island, Mwanza, northwestern Tanzania”

Research Clearance Certificate No. CREC/156/2016

Prevalence of intestinal protozoan infections by stool microscopy and PCR as a baseline benchmark to monitor further hygiene, water and sanitation measures in Ijinga Island, Mwanza, northwestern Tanzania

Introduction:

Intestinal protozoa infections occur frequently in Sub-Saharan Africa and may cause severe disease. However, very little prevalence data of intestinal protozoan infections are available.

As a part of the SchistoControl project on Ijinga Island in Magu District, northwestern Tanzania, this investigation aims to determine at baseline the prevalence of intestinal protozoan infections. The investigation will focus on *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica/dispar*, *Entamoeba coli* and *Cryptosporidium parvum/hominis* known as protozoan infections of high prevalence in Sub-Saharan Africa. Intestinal protozoan infections are strongly associated with inadequate water and sanitation facilities as well as hygiene (WASH) behaviour (1,2). As recent studies show, improved access to WASH reduces the rate of intestinal protozoan infections drastically (2,3,4). According to that, we hypothesize that protozoan infections may reflect the standard of hygiene on the island and serve as a biomarker.

In the course of the pilot project measures to enable access to clean water and sanitation facilities for the residents will take place in order to improve the hygiene conditions to decrease Schistosomiasis and soil-transmitted helminth infections on Ijinga Island. Thus the reduction of the prevalence of intestinal protozoan infections could serve as a marker to evaluate the success of the WASH interventions. Therefore baseline data before the

interventions take place are needed. Consequently, a follow up investigation will be conducted in 2021, after the interventions have taken place.

Project goal:

To determine the baseline prevalence of intestinal protozoan infections as a benchmark to evaluate and monitor public health education programs and WASH measures in the course of the SchistoControl Project on Ijinga Island, Magu district, northwestern Tanzania.

Specific objectives:

-To determine at baseline the prevalence of *G.intestinalis*, *E.histolytica/E.dispar*, *E.coli* and *Cryptosporidium parvum/hominis* in stool samples of the study participants of the main project

-To differentiate pathogenic *E. histolytica* from a pathogenic *E.dispar* via PCR

Study Design and Methods:

This will be a cross-sectional study conducted among the existing study population of the main project, children aged 6 months to 18 years and adult individuals ≥ 18 years living on Ijinga island and meeting the inclusion criteria defined in the submitted proposal (Research Clearance Certificate No. CREC/156/2016). We will use stool samples that have already been collected and preserved in ethanol and formalin in the course of the main project in 2016. These samples will be examined to determine the prevalence of *G.intestinalis*, *Entamoeba histolytica/dispar*, *Entamoeba coli* and *Cryptosporidium parvum/hominis*. The formalin preserved specimen will be concentrated using Sodium Acetate-acetic acid-Formalin (SAF) method and then examined under the light microscope. DNA will be extracted from stool samples preserved in ethanol and examined using Real Time PCR according to a standard protocol. Microscopical and PCR examinations will be done in the research laboratory of the Medical Mission Institute in Würzburg, Germany.

Ethical considerations and treatments:

As the stool samples were already collected in 2016, no further samples are needed and the additional laboratory investigations will not cause any inconvenience for the study participants. Due to the elapsed time since sampling no therapeutic consequences will result from eventual positive findings. On the one hand asymptomatic infections with *G. intestinalis* or *Cryptosporidium spp.* are common in high prevalent regions and a specific treatment is not mandatory. Furthermore, infections with *Entamoeba dispar* and *Entamoeba coli* generally do not require any treatment as they are considered to be apathogenic (5). On the other hand patients with symptomatic *E. histolytica* infections are expected to have already sought medical consultancy for diagnosis and treatment.

Budget

The Study will be financed by funds of the Medical Mission Institute Würzburg. The main part of the costs are the reagents for the PCR analyses, varying from 6 to 8 € per sample and test.

Dissemination of Results

Results will be published and presented at national and international scientific conferences.

Literature:

1. Stanley SL., Jr. „Amoebiasis“. *Lancet* (2003) 361:1025–34. doi:10.1016/S0140-6736(03)12830-9
2. Matthys, Barbara, Mohion Bobieva, Gulzira Karimova, Zulfira Mengliboeva, Vreni Jean-Richard, Malika Hoimnazarova, Matluba Kurbonova, Laurent K Lohourignon, Jürg Utzinger, and Kaspar Wyss. “Prevalence and risk factors of helminths and intestinal protozoa infections among children from primary schools in western Tajikistan. *Parasites & Vectors* 4 (October 7, 2011): 195. doi:10.1186/1756-3305-4-195.
3. Choy, Seow Huey, Hesham M. Al-Mekhlafi, Mohammed A. K. Mahdy, Nabil N. Nasr, Maria Sulaiman, Yvonne A. L. Lim, and Johari Surin. “Prevalence and Associated Risk Factors of Giardia Infection among Indigenous Communities in Rural Malaysia.” *Scientific Reports* 4 (November 4, 2014). doi:10.1038/srep06909.
4. Curtis, Val, and Sandy Cairncross. “Effect of Washing Hands with Soap on Diarrhoea Risk in the Community: A Systematic Review.” *The Lancet. Infectious Diseases* 3, no. 5 (May 2003): 275–81.
5. Diamond, L. S., Clark C. G. (1993) A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**:340–344.

Annex II: Physische Karte Tansania und Magu Distrikt



Karte Tansania und Magu Distrikt

(Quelle: Ezilon, 2009, gemäß Nutzungsrichtlinien)

Annex III: Karte Ijinga Island



Karte Ijinga Island (Quelle: Google Earth, 2020, gemäß Nutzungsrichtlinien)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen jenen Menschen danken, die mich bei der Planung, Umsetzung und Durchführung meiner Dissertation unterstützt haben. Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. August Stich für die Betreuung und ausführliche Durchsicht der Manuskripte bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Klaus Brehm für die Übernahme des Koreferates.

Mein herzlicher Dank gilt Dr. Andreas Müller für die Anleitung, gemeinsame Planung und Umsetzung des Projektes sowie die konstruktiven Korrekturvorschläge und die Zurverfügungstellung der mikroskopischen Bilder. Besonders danke ich Antje Fuß für die stetige Ansprechbarkeit, die ausdauernde Unterstützung und Hilfestellungen vor allem bei den Laboruntersuchungen, aber auch bei allen anderen Fragen und Problemen.

Des Weiteren danke ich Dr. Mazigo sowie dem kompletten Feldstudienteam in Mwanza, Tansania für die gute Zusammenarbeit.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Familie und meiner Freundin Clara.