

**Evaluierung des Nachweises von *Schistosoma mansoni*
DNA mittels Real-Time PCR in verschiedenen humanen
Proben sowie den Zwischenwirtschnecken in einer
Hochprävalenzregion am Viktoriasee in Tansania**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Antje Fuß
aus Bad Salzungen

Würzburg, 2020



Eingereicht am: 14.07.2020

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Jochen Krauss

Gutachter: Prof. Dr. Klaus Brehm

Gutachter: Prof. Dr. Christian Stigloher

Tag des Promotionskolloquiums: 21.10.2020

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung (Affidavit)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Evaluierung des Nachweises von *Schistosoma mansoni* DNA mittels Real-Time PCR in verschiedenen humanen Proben sowie den Zwischenwirtschnecken in einer Hochprävalenzregion am Viktoriasee in Tansania**“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: „**Evaluation of the detection of *Schistosoma mansoni* DNA by real-time PCR in different human samples and the intermediate host snails in a high prevalence region at Lake Victoria in Tanzania**“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Besides I declare that if I do not hold the copyright for figures and paragraphs, I obtained it from the rights holder and that paragraphs and figures have been marked according to law or for figures taken from the internet the hyperlink has been added accordingly.

Würzburg, den _____

Inhaltsverzeichnis

Erklärung (Affidavit).....	iii
Eidesstattliche Erklärung.....	iii
Affidavit.....	iii
Zusammenfassung	1
Summary	4
1. Einleitung	7
1.1 Definition.....	7
1.2 Epidemiologie.....	7
1.3 Entwicklungszyklus.....	8
1.4 Zwischenwirt.....	9
1.5 Pathogenese, Morbidität & Mortalität.....	10
1.6 Schistosomiasis in Tansania.....	12
1.7 Diagnose der Schistosomiasis.....	13
1.7.1 Parasitologische Methoden.....	13
1.7.2 Immundiagnostische Verfahren.....	14
1.7.3 Indirekte Diagnoseverfahren.....	15
1.7.4 Molekulare Methoden.....	16
1.7.5 Untersuchung des Zwischenwirtes.....	17
1.8 Behandlung.....	17
1.9 Prävention & Kontrolle.....	19
2. Problemstellung & Zielsetzung	21
3. Material & Methoden	24
3.1 Studienorte und Studienteilnehmer.....	24
3.2 Ethik und Zustimmung zur Teilnahme.....	25
3.3 Labormethoden.....	26
3.3.1 Mikroskopische Stuhluntersuchung mittels Kato-Katz Technik.....	26
3.3.2 Urinbasierter POC-CCA Schnelltest.....	27
3.3.3 Nachweis von <i>S. haematobium</i>	27
3.3.4 Probenhandling und DNA Extraktion (Stuhlproben, Urinproben, Serum, DBS, Urinfilter).....	27
3.3.5 Real-Time PCR.....	29
3.3.5 HIV Testung.....	31
3.4 Malakologische Untersuchungen.....	31

3.4.1 Schneckensammlung.....	31
3.4.2 DNA Extraktion.....	32
3.4.3 Real-Time PCR.....	32
3.4.4 Sequenzierung.....	32
3.4.5 Wasserparameter.....	32
3.5 Statistik.....	33
3.5.1 Analyse der verschiedenen diagnostischen Tests aus humanen Probenmaterial.	33
3.5.2 Malakologische Datenanalyse.....	34
4. Ergebnisse.....	35
4.1 Studie zum Nachweis von <i>S. mansoni</i> DNA in Stuhlproben mittels Real-Time PCR ...	35
4.1.1 Charakterisierung der Studienpopulation.....	35
4.1.2 Prävalenz und Intensität der <i>Schistosoma mansoni</i> Infektion.....	35
4.1.3 Sensitivität und Spezifität.....	37
4.1.4 Korrelation zwischen C _r -Werten, Anzahl Eiern im Stuhl und Intensität der POC-CCA-Testbanden.....	37
4.2 Studie zum Nachweis von <i>S. mansoni</i> DNA in Urinproben, Serum und <i>dried blood spot cards</i> mittels Real-Time PCR.....	40
4.2.1 Charakterisierung der Studienpopulation.....	41
4.2.2 Prävalenz und Intensität der <i>Schistosoma mansoni</i> Infektion.....	41
4.2.3 Prävalenz HIV-Infektion.....	42
4.2.4 Verwendung der serumbasierten Real-Time PCR zum Nachweis von <i>S. mansoni</i> DNA vor und nach Behandlung mit Praziquantel.....	42
4.2.5 Nachweis von <i>S. mansoni</i> spezifischer DNA mittels Real-Time PCR aus Serumproben im Vergleich zu <i>dried blood spot cards</i>	45
4.2.6 Performance der KK-Methode, des POC-CCA-Tests und der serumbasierten Real-Time PCR in Abhängigkeit vom HIV-Status.....	47
4.3 Malakologische Studie auf der Insel Ijinga.....	49
4.3.1 <i>Baseline-Screening</i> der humanen Bevölkerung.....	49
4.3.2 <i>Baseline</i> -Untersuchung des Zwischenwirtes.....	52
4.3.3 Untersuchungen der Sentinelgruppe.....	56
4.3.4 Malakologische Analyse nach 4 Behandlungsrunden der humanen Bevölkerung	59
5. Diskussion.....	63
5.1 Studie zum Nachweis von <i>S. mansoni</i> DNA in Stuhlproben mittels Real-Time PCR ...	63
5.2 Studie zum Nachweis von <i>S. mansoni</i> DNA in Urinproben, Serum und <i>dried blood spot cards</i> mittels Real-Time PCR.....	65
5.2.1 Verwendung der serumbasierten Real-Time PCR zum Nachweis von <i>S. mansoni</i> DNA vor und nach Behandlung mit Praziquantel.....	65
5.2.2 Nachweis von <i>S. mansoni</i> spezifischer DNA mittels Real-Time PCR aus Serumproben im Vergleich zu <i>dried blood spot cards</i>	67

5.2.3 Performance der KK-Methode, des POC-CCA-Tests und der serumbasierten Real-Time PCR abhängig vom HIV-Status	68
5.3 Malakologische Studie auf der Insel Ijinga.....	69
5.3.1 <i>Baseline</i> -Screening der humanen Bevölkerung und des Schneckenzwischenwirtes	69
5.3.2 Untersuchungen der Sentinelgruppe und malakologische Analyse nach 4 Behandlungsrunden der humanen Bevölkerung	72
6. Abkürzungsverzeichnis	76
7. Abbildungsverzeichnis	79
8. Literaturverzeichnis	80
9. Publikationen & Kongressbeiträge	102
9.1 Publikationen	102
9.2 Kongressbeiträge	102
10. Danksagung	104
11. Anhang	105
11.1 Ethik	105
11.1.1 Genehmigung der Ethikkommission für die Studie „Comparison of sensitivity and specificity of three diagnostic tests to detect <i>Schistosoma mansoni</i> infections in school children in Mwanza region, Tanzania“	105
11.1.2 Genehmigungen der Ethikkommissionen für die Studie „Diagnostic accuracy and applicability of molecular approaches for the detection of schistosome DNA in human blood and urine samples pre- and post-treatment“	106
11.1.3 Genehmigungen der Ethikkommissionen für die Studien auf der Insel Ijinga unter dem Titel „Proof of concept study on sustainable schistosomiasis elimination through an integrated community based approach on Ijinga Island, Mwanza, Northwestern Tanzania“	108
11.2 Aufklärungsbogen & Einverständniserklärung (Beispiel).....	114

Zusammenfassung

Die Schistosomiasis ist nach wie vor eine der häufigsten parasitären Erkrankungen der Welt und verursacht erhebliche gesundheitliche und wirtschaftliche Folgen, insbesondere in ärmeren, ländlichen Regionen. Durch Immunreaktionen auf die im Wirt abgelegten Eier des Parasiten können sich chronische Verlaufsformen manifestieren. Dabei kann es zu irreversiblen Schäden kommen. Um dies zu verhindern sind eine frühe und sichere Diagnose sowie eine Behandlung mit Praziquantel (PZQ) unabdingbar. Zudem spielt der zuverlässige Nachweis der Schistosomiasis eine Schlüsselrolle bei der Überwachung, Prävention und Kontrolle der Erkrankung. In epidemiologischen Studien findet am häufigsten die mikroskopische Kato-Katz (KK)-Methode zum Nachweis von *Schistosoma mansoni* Eiern im Stuhl Anwendung. Dieses Verfahren ist äußerst spezifisch und bietet die Möglichkeit der Quantifizierung, wodurch die Intensität der vorliegenden Infektion bestimmt werden kann. Die Sensitivität der Testmethode ist jedoch nur moderat, insbesondere bei einer niedrigen Infektionsintensität. Zudem kann eine Infektion erst nach der Präpatenzzeit nachgewiesen werden. Der ebenfalls häufig eingesetzte urinbasierte *Point-of-Care Circulating Cathodic Antigen* (POC-CCA)-Test weist zwar eine höhere Sensitivität aber geringere Spezifität als das KK-Verfahren auf. Als hochsensitive und sehr spezifische Methode zur Diagnose der Schistosomiasis hat sich der Nachweis von *Schistosoma*-spezifischer DNA mittels Real-Time PCR herausgestellt. Allerdings wird für die Durchführung dieser Technik ein gut ausgestattetes Labor benötigt, das sich in der Regel nicht in unmittelbarer Nähe zum Patienten im Feld befindet. Daher ist es besonders wichtig, über praktikable und schnelle Konservierungsmethoden zu verfügen, die bevor die Extraktion und Amplifikation der DNA stattfindet, einen einfachen Transport und eine einfache Lagerung des Probenmaterials ermöglichen.

Das Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war, die Sensitivität und Spezifität der klassischerweise verwendeten KK-Methode und des POC-CCA-Tests mit der Real-Time PCR- Methode unter Verwendung von Stuhlproben, Urinproben, Serumproben sowie auf Filterpapier getrocknete Blutproben (*dried blood spots* – DBSs) zu vergleichen. Zudem wurde die Anwendbarkeit der Real-Time PCR aus Serum- und Urinproben zur Therapiekontrolle überprüft. Die dazu notwendigen Studien wurden alle in der Region Mwanza in Tansania durchgeführt, welche als hochendemisch für *S. mansoni* gilt. Für die Untersuchungen zur stuhlbasieren Real-Time PCR wurden als Studienteilnehmer Schulkinder gewählt. Aufgrund der erforderlichen Blutabnahme wurden die anderen Teilstudien nur mit erwachsenen Probanden durchgeführt. Unter Verwendung der KK-Methode als Goldstandard erzielten die Real-Time PCR aus Stuhlproben und der POC-CCA-Test sehr hohe Sensitivitäten von 99,5% bzw. 89,7%, jedoch nur geringe Spezifitäten von 29,55% und

22,73%. Die KK-Methode weist bekanntermaßen nur eine geringe bis moderate Sensitivität auf und ist daher nicht gut als Referenz geeignet. Deshalb wurde zusätzlich eine latente Klassenanalyse angewandt, um die tatsächlich Erkrankten zu ermitteln und anhand dieser die diagnostische Güte der verwendeten Tests zu bestimmen. Hier zeigte der POC-CCA-Test die höchste Sensitivität (99,5%) sowie eine Spezifität von 63,4%. Der Real-Time PCR-Test hatte eine Sensitivität von 98,7% und die höchste Spezifität (81,2%). Die Spezifität der KK-Technik betrug 72,8%, die Sensitivität war signifikant niedriger (89,7%) als bei den anderen beiden Methoden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der POC-CCA-Schnelltest empfindlicher ist als die KK-Methode und zum Screening von *S. mansoni*-Infektionen eingesetzt werden kann. Die Stuhl-PCR war zwar ebenfalls hochsensitiv und zeigte unter den drei getesteten Diagnoseverfahren die höchste Spezifität, aber aufgrund der höheren Kosten und der komplizierten Anwendung sollte für epidemiologische Untersuchungen in Hochprävalenzregionen der POC-CCA-Test bevorzugt werden. Bei unklaren Diagnosen kann die Real-Time PCR-Methode als Bestätigungstest Anwendung finden.

In der Teilstudie zur serum- und urinbasierten Real-Time PCR in einer endemischen Region vor und nach der Behandlung mit PZQ wurden folgende Ergebnisse erzielt: Unter Verwendung einer kombinierten Referenz aus den Ergebnissen des parasitologischen KK-Tests und / oder der serumbasierten PCR konnte zu Studienbeginn eine Prävalenz von *S. mansoni* von 77,1% ermittelt werden. In Bezug auf die Sensitivität zeigte der DNA-Nachweis aus Serum (96,3%) und der POC-CCA-Assay (77,8%) die höchsten Ergebnisse. Die urinbasierte Real-Time PCR zeigte die geringste Empfindlichkeit (33,3%). Durch die Behandlung mit Praziquantel wurde eine signifikante Reduktion der *S. mansoni* Prävalenz erreicht. Zwanzig Wochen nach Therapie konnte durch die KK-Methode keine, mit dem POC-CCA-Test 33,3% und mit der serumbasierten Real-Time PCR 58,3% Infektionen festgestellt werden. Die Analyse der mittels der serumbasierten PCR bestimmten mittleren C_t -Werte im zeitlichen Verlauf zeigte, dass dieser eine Woche nach der Behandlung signifikant abnahm (von 30,3 auf 28) und 20 Wochen später über den Basiswert (34,9) anstieg. Der C_t -Wert ist umgekehrt proportional zur DNA-Ausgangsmenge, die in die PCR eingesetzt wurde. Dies deutet darauf hin, dass kurz nach der Therapie ein DNA-Anstieg zu verzeichnen war und 20 Wochen später weniger DNA als zu Beginn der Studie nachweisbar war. Dieser DNA-Verlauf lässt verschiedene Interpretationsmöglichkeiten zu. Die Daten zeigen jedoch, dass die serumbasierte Real-Time PCR eine ausgezeichnete diagnostische Genauigkeit aufweist. Da die nachgewiesene DNA jedoch keine Rückschlüsse auf das Parasitenstadium zulässt und es sich hierbei auch um DNA aus im Gewebe verbliebenen Eiern oder Reinfektionen handeln könnte, ist diese Methode in Hochprävalenz-Regionen nicht zur Therapiekontrolle geeignet. Die Verwendung von Urin zum DNA-Nachweis erzielte keine vielversprechenden Ergebnisse. Die Sensitivität der Real-Time PCR aus DBSs war ebenfalls sehr gering (45,4%) und kann ohne weitere

ausführliche Testung hinsichtlich Lagertemperatur, Lagerdauer, verschiedener Filterpapierarten und Extraktionsmethoden nicht empfohlen werden.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse dieser Studien, dass sowohl die stuhl- als auch die serumbasierte Real-Time PCR bei der Erkennung und Bewertung der Infektionsprävalenz, einem wichtigen Aspekt epidemiologischer Studien, deutlich empfindlicher ist als das mikroskopische KK-Verfahren. Aufgrund des hohen Kosten- und Personalaufwandes und der Notwendigkeit eines gut ausgestatteten Labors wird sich diese Methode aber nicht zum Screening in hochendemischen Ländern durchsetzen. Sie kann jedoch einen Mehrwert bei der Diagnose der Schistosomiasis bieten, vor allem bei frühen oder leichten Infektionen. Zudem kann diese hochsensitive und spezifische Methode als Bestätigungstest bei unklaren Diagnosen herangezogen werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden malakologische Untersuchungen zur Identifizierung potenzieller Übertragungsorte für die Schistosomiasis rund um die im Viktoriasee gelegene Insel Ijunga durchgeführt. Diese Analysen fanden innerhalb eines Pilotprojektes zur Eliminierung der Erkrankung auf der Insel Ijunga statt, wobei ein intensiviertes Behandlungsprotokoll, welches die gesamte Inselbevölkerung einschloss, Anwendung fand. Die Kontrolle der Praziquanteleffektivität nach mehreren Behandlungsrunden bringt eine Reihe diagnostischer Herausforderungen mit sich. Hier könnte die Beurteilung der *Schistosoma*-Infektion in den Zwischenwirtschnecken vor und nach der Therapie als Indikator für den Erfolg der Maßnahme dienen. Zu diesem Zweck erfolgte zunächst eine *Baseline*-Untersuchung, bei der Schnecken an Uferregionen gesammelt wurden, an denen die Inselbewohner häufigen Wasserkontakt hatten. Die Schnecken wurden anhand morphologischer Merkmale identifiziert und mithilfe der Real-Time PCR-Methode auf Infektionen mit *S. mansoni* untersucht. Insgesamt wurden 35,4% (279/788) *S. mansoni*-positive Zwischenwirtschnecken (*Biomphalaria*) detektiert. Dies verdeutlicht, dass an den meisten Wasserkontaktstellen um die Insel Ijunga ein potentielles Risiko für die Übertragung der Schistosomiasis besteht. Die mithilfe der KK-Methode ermittelte Gesamtprävalenz von *S. mansoni* in der humanen Bevölkerung betrug 68,9%. Nachdem die Bewohner der Insel viermal mit PZQ behandelt wurden, zeigte sich in der kontinuierlich überwachten Sentinelgruppe eine Reduktion der Prävalenz auf 28,7%. Zu diesem Zeitpunkt wurde ebenfalls die Analyse der Schnecken wiederholt und es konnten 16,8% (57/350) Schnecken mit einer *S. mansoni* Infektion nachgewiesen werden. Die Reduktion der Infektionshäufigkeit in den Schnecken vor und nach der viermaligen Behandlung der Bevölkerung war signifikant ($\chi^2 = 74.335$, $p < 0,001$). Dies deutet darauf hin, dass die intermediären Wirtsschnecken zur Überwachung von Kontrollmaßnahmen verwendet werden können.

Summary

Schistosomiasis remains one of the most common parasitic infections in the world, causing significant health and economic consequences, particularly in rural areas. Immune reactions to the parasite's eggs deposited in the host can lead to chronic progression. This may result in to irreversible damage. In order to prevent this, an early and reliable diagnosis and a concomitant therapy will be indispensable. In addition, the reliable detection of schistosomiasis plays a key role in monitoring, prevention and control of the disease. In epidemiological studies, the microscopic Kato-Katz (KK) method is most frequently used to detect eggs in stool. This method is highly specific and offers the possibility of quantification, which allows to determine the intensity of the existing infection. However, especially at low infection intensities, the sensitivity of the test method is rather moderate. Furthermore, infections can only be detected after the prepatent period. The also frequently used urine-based Point-of-Care Circulating Cathodic Antigen (POC-CCA) test shows a higher sensitivity but lower specificity than the KK method. The detection of schistosome-specific DNA through Real-Time PCR has proven to be a highly sensitive and very specific method for the diagnosis of schistosomiasis. However, this assay requires a well-equipped laboratory, which is usually not located in the immediate vicinity of the patient in the field. Therefore, it is particularly important to have practical and rapid preservation methods that allow easy transport and storage of the sample material before DNA extraction and amplification takes place.

The aim of the first part of this dissertation was to compare the sensitivity and specificity of the classical KK method and the POC-CCA test with the Real-Time PCR method using stool samples, urine samples, serum samples and blood samples dried on filter paper (dried blood spots – DBS). In addition, tests were conducted regarding the applicability of Real-Time PCR from serum and urine samples for therapy control. The necessary studies were all carried out in the Mwanza region of Tanzania, which is considered to be highly endemic for *S. mansoni*. Schoolchildren were selected as study participants for the studies on stool-based Real-Time PCR. Due to the required blood collection, the other partial studies were conducted with adults only. Using the KK method as gold standard, the Real-Time PCR from stool samples and the POC-CCA test achieved very high sensitivities of 99.5% and 89.7%, respectively, but only low specificities of 29.55% and 22.73%. The KK method is known to have low to moderate sensitivity and is therefore not well suited as a reference. For this reason, a latent class analysis was carried out to determine the true patients and the diagnostic quality of the tests used. The POC-CCA test showed the highest sensitivity (99.5%) and a specificity of 63.4%. The Real-Time PCR test had a sensitivity of 98.7% and the highest specificity (81.2%). The specificity of the KK technique was 72.8%, the sensitivity was significantly lower (89.7%) than with the other two methods.

These results show that the POC-CCA rapid test is more sensitive than the KK method and can be used to screen for *S. mansoni* infections. Although stool PCR is also highly sensitive and shows the highest specificity of the three diagnostic methods tested, the POC-CCA test should be preferred for epidemiological investigations in high prevalence regions on account of the higher costs and complicated application. If the diagnosis is unclear, the Real-Time PCR method can be used as a confirmatory test.

The following results were obtained in the partial study regarding the use of serum and urine-based Real-Time PCR in an endemic region before and after treatment with Praziquantel (PZQ): Using a combined reference of the results of the parasitological KK test and / or the serum-based PCR, a prevalence of *S. mansoni* of 77.1% could be determined at the beginning of the study. In terms of sensitivity, DNA detection from serum (96.3%) and the POC-CCA assay (77.8%) showed the highest results. Urine-based Real-Time PCR showed the lowest sensitivity (33.3%). Treatment with Praziquantel significantly reduced the prevalence of *S. mansoni*. Twenty weeks after therapy, no infections could be detected with the KK method, 33.3% with the POC-CCA test and 58.3% with the serum-based Real-Time PCR. Analysis of mean

C_t -values determined by serum-based Real-Time PCR over time showed that it decreased significantly (from 30.3 to 28) one week after treatment and increased above the baseline value (34.9) 20 weeks later. The C_t -value is inversely proportional to the initial amount of DNA added to the PCR. This suggests that shortly after therapy there was an increase in DNA and 20 weeks later less DNA was detectable compared to the beginning of the study. This DNA progression offers various interpretation possibilities. However, the data show that serum-based Real-Time PCR has excellent diagnostic accuracy. Yet, since the detected DNA does not allow conclusions to be drawn about the parasite stage and this could also be DNA from eggs remaining in the tissue or reinfections, this method is not suitable for therapy control in high prevalence regions. The use of urine for DNA detection did not yield promising results. The sensitivity of the Real-Time PCR from DBSs was also very low (45.4%) and cannot be recommended without further extensive testing with regard to storage temperature, storage time, different filter paper types and extraction methods.

In summary, the results of these studies showed that Real-Time PCR is significantly more sensitive than microscopy in the detection and evaluation of infection prevalence, an important aspect of epidemiological studies. However, due to the high costs and personnel involved and the need for a well-equipped laboratory, this method will not be accepted for screening in high-endemic countries. Yet, it can provide added value in the diagnosis of schistosomiasis, especially in early or light infections. In addition, this highly sensitive and specific method can be used as a confirmatory test for unclear diagnoses.

The second part of this dissertation describes malacological investigations to identify potential transmission sites for schistosomiasis around Ijinga Island located on Lake Victoria. These analyses took place as part of a pilot project to eliminate the disease on this island, using an intensified treatment protocol that included the entire island population. The control of Praziquantel effectiveness after several rounds of treatment poses a number of diagnostic challenges. Here, the assessment of the schistosoma infection in the intermediate host snails before and after the therapies could serve as an indicator for the success of the measure. For this purpose, a baseline study was carried out, in which snails were collected from shore regions where the islanders had frequent contact with water. The snails were identified on the basis of morphological characteristics and examined for infections with *S. mansoni* using the Real-Time PCR method. A total of 35.4% (279/788) *S. mansoni* positive intermediate host snails (*Biomphalaria*) were detected. This shows that there is a potential risk of schistosomiasis transmission at most water contact points around Ijinga. The total prevalence of *S. mansoni* in the human population determined by the KK method was 68.9%. After treating the community with Praziquantel four times, the prevalence of *S. mansoni* in the continuously monitored sentinel group was reduced to 28.7%. At this time, the analysis of the snails was repeated and 16.8% (57/350) snails with a *S. mansoni* infection were detected. The reduction in the frequency of infection in the snails before and after the fourfold treatment of the population was significant ($\chi^2 = 74,335$, $p < 0.001$). This suggests that the intermediate host snails can be used to monitor control measures.

1. Einleitung

1.1 Definition

Die Schistosomiasis ist eine parasitäre Infektionskrankheit, die durch Trematoden der Gattung *Schistosoma* verursacht wird [1]. Als synonyme Bezeichnung wird häufig Bilharziose - nach dem deutschen Tropenarzt Theodor Bilharz, der 1851 adulte Stadien des Erregers bei einer Obduktion in einer Kairoer Klinik entdeckte - verwendet [2,3]. Die Schistosomiasis wird zu den vernachlässigten Tropenkrankheiten (*neglected tropical diseases* – NTDs) gezählt [4] und betrifft vor allem ärmere Menschen, die in ländlichen Gebieten leben und oftmals keinen Zugang zu sauberem Wasser und keine adäquate Sanitärversorgung haben [5]. Der Übertragungszyklus des Parasiten erfordert die Kontamination von Wasser mit menschlichen Fäkalien, bestimmte Süßwasserschnecken als Zwischenwirte und den Kontakt des Menschen mit zerkarienhaltigem Wasser [6]. Die Infektion kann beim Fischfang, bei landwirtschaftlichen Tätigkeiten, bei Haushaltstätigkeiten wie dem Holen von Wasser, dem Waschen der Kleidung oder beim Spielen der Kinder in zerkarienhaltigem Wasser erfolgen [5]. Entsprechend der Lokalisation der adulten Schistosomen im Menschen (urogenitale oder mesenteriale Venen) und dem daraus resultierenden Krankheitsbild lassen sich zwei Hauptformen der Erkrankung unterscheiden:

- die urogenitale Schistosomiasis oder Blasenbilharziose (verursacht durch *Schistosoma haematobium*)
- die intestinale Schistosomiasis oder Darmbilharziose (verursacht durch *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi* und *S. intercalatum*) [1].

1.2 Epidemiologie

Zu den wichtigsten humanpathogenen Arten gehören *S. haematobium*, *S. mansoni* und *S. japonicum*. *Schistosoma haematobium* und *S. mansoni* kommen sowohl in Afrika als auch im Nahen Osten vor und sind für die Hauptkrankheitslast in Afrika südlich der Sahara ursächlich [6]. *Schistosoma mansoni* tritt zudem auf dem amerikanischen Kontinent auf. *Schistosoma japonicum* ist in Asien, vor allem auf den Philippinen und in China verbreitet. Die Schistosomiasis kann darüber hinaus durch drei weitere, lokal verbreitete Arten verursacht werden: *S. mekongi* im Mekong-Becken sowie *S. guineensis* und *S. intercalatum* in West- und Zentralafrika [1]. In 78 Ländern wurden Fälle von Schistosomiasis ermittelt, in 52 dieser Länder tritt die Erkrankung endemisch mit mäßigen bis hohen Übertragungsraten auf. Schätzungen zufolge leben weltweit etwa 779 Millionen Menschen in Übertragungsgebieten und sind damit der Gefahr einer Infektion ausgesetzt [7]. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) hätten im Jahr 2017 mindestens 220,8 Millionen Menschen eine präventive Therapie gegen Schistosomiasis benötigt, weniger als die Hälfte (102,3

Millionen) wurden behandelt [5]. Über 90% der Betroffenen leben in Afrika südlich der Sahara. Zu den Ländern mit der höchsten Prävalenz zählen Nigeria (29 Millionen), die Vereinigte Republik Tansania (19 Millionen), Ghana und die Demokratischen Republik Kongo (beide 15 Millionen) [8,9].

1.3 Entwicklungszyklus

Wenn Eier der Parasiten über menschliche Exkrete in Süßwasser gelangen, schlüpfen Mirazidien (Wimpernlarven), die sich mithilfe von Zilien fortbewegen können und spezielle Süßwasserschnecken als geeigneten Zwischenwirt aufsuchen und infizieren [10]. In der Schnecke findet eine asexuelle Vermehrung zu Mutter- und Tochtorsporozysten und schließlich zu tausenden Zerkarien (Gabelschwanzlarven) statt, die von der Schnecke wieder ins Wasser ausgeschieden werden [11–13]. Der Entwicklungszyklus innerhalb der Schnecken dauert ca. vier bis sechs Wochen [14]. Die infektiösen Zerkarien können im Wasser ca. ein bis drei Tage überleben [15]. Durch ihren gegabelten Schwanz sind sie zur Bewegung befähigt und müssen im Wasser einen geeigneten Endwirt auffinden. Um die Haut des Menschen zu durchdringen, reichen den Larven wenige Minuten aus [16,17]. Die Zerkarien verlieren dabei ihren Gabelschwanz und gelangen als Schistosomula in die Kapillaren und Lymphgefäße [10]. Über Blutgefäße folgt eine Wanderung über Lunge [18] und Leber und schließlich gelangen die jungen Würmer in den Pfortaderkreislauf [10,14]. Die Reifung zu adulten Schistosomen dauert insgesamt ca. fünf bis sieben Wochen [1]. Nach der Verpaarung wandern die Wurm-pärchen zu den Mesenterialvenen (*S. mansoni*, *S. japonicum* und *S. intercalatum*) oder zum Venenplexus der Harnblase (*S. haematobium*) [10]. Die adulten, getrenntgeschlechtlichen Würmer sind ca. 7 bis 20 mm lang und ernähren sich durch anaerobe Glykolyse von Blut, aus welchem sie weiterhin Aminosäuren für das Wachstum, die Entwicklung und Reproduktion gewinnen [14,19]. Die anfallenden Endprodukte des Blutverdaus, z.B. Hämozoin aus dem Hämoglobinabbau, sammeln sich im Darm der Schistosomen und werden ins Blut des Wirtes ausgewürgt [10,14]. Die Weibchen produzieren täglich hunderte (afrikanische Arten) bis tausende (orientalische Arten) Eier [14]. Diese gelangen nach einer Durchwanderung der Organwand und Schleimhaut in das Lumen des Darmes (intestinale Arten) bzw. der Harnblase (*S. haematobium*) und werden schließlich über Stuhl oder Urin ausgeschieden, wo sie bis zu sieben Tage lebensfähig bleiben können [14]. Die Lebensdauer der erwachsenen Schistosomen beträgt im Durchschnitt fünf bis zehn Jahre [20].

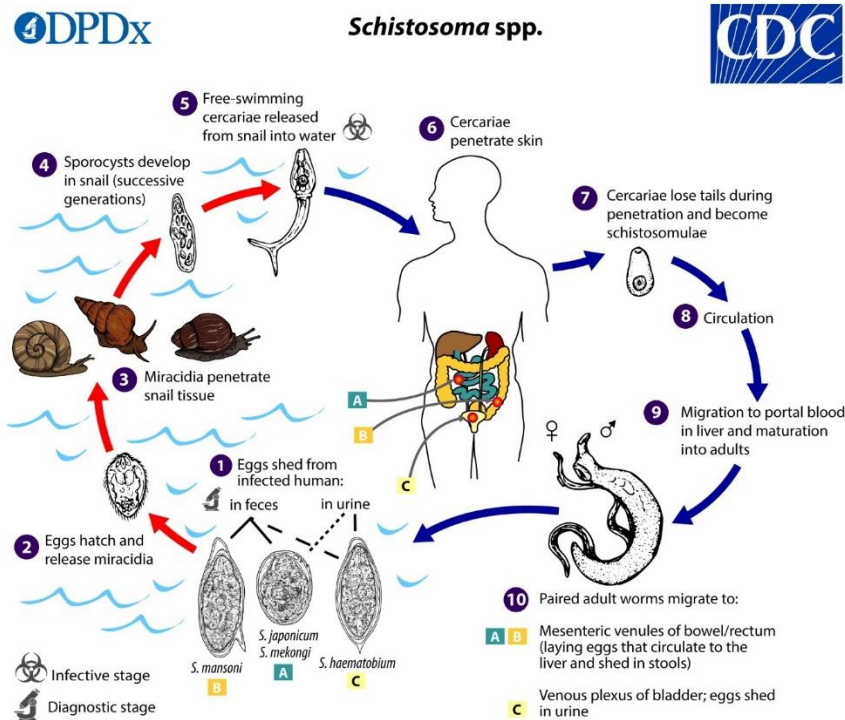


Abbildung 1: Lebenszyklus von *Schistosoma* spp. (Quelle: CDC/ Alexander J. da Silva, PhD; Melanie Moser, <https://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/index.html>, frei von urheberrechtlichen Einschränkungen, Abrufdatum 23.03.2020)

1.4 Zwischenwirt

Der komplexe Lebenszyklus von *Schistosoma* spp. beinhaltet spezifische Süßwasserschnecken als Zwischenwirte. Die geographische Verbreitung der Schistosomiasis ist vom Vorhandensein dieser Schneckenzwischenwirte abhängig [21–24]. *Schistosoma mansoni* benötigt Süßwasserschnecken der Gattung *Biomphalaria*, *S. haematobium* und *S. intercalatum* Schnecken der Gattung *Bulinus*, *S. japonicum* amphibische Schnecken der Gattung *Oncomelania* und *S. mekongi* *Tricula*-Schnecken als Zwischenwirte [1,25]. In Afrika dienen Schnecken der beiden Gattungen *Biomphalaria* und *Bulinus* als Vektoren für die Schistosomiasis. Als geeignete Lebensräume kommen fast alle pflanzenreichen Süßgewässer, von kleinen temporären Teichen und Bächen bis hin zu großen Seen und Flüssen in Betracht [25]. In den letzten Jahrzehnten sind zudem künstlich angelegte Stauseen und Bewässerungssysteme als Lebensräume für Wasserschnecken hinzugekommen und haben zur Verbreitung der Schistosomiasis beigetragen [26,27]. In Subsahara-Afrika leben Schätzungen zufolge 76% der Bevölkerung in der Nähe von Gewässern, die Zwischenwirtschnecken enthalten [28]. Zahlreiche Studien konnten einen direkten Zusammenhang zwischen der Nähe des Wohnortes zu solchen kontaminierten Wasserstellen und den Infektionsraten zeigen [29,30]. Die Größe der Schneckenpopulation und die Übertragungsraten können durch saisonale Schwankungen in der Niederschlagsmenge, des Wasserstands und der Temperatur maßgeblich beeinflusst werden [25]. In Tansania, entlang

des Viktoriasees sind *Biomphalaria choanomphala*, *B. pfeifferi*, *B. sudanica* und *B. angulosa* die bedeutendsten Zwischenwirtarten für *S. mansoni* [21,22,31]. *Biomphalaria sudanica* kommt überwiegend in der Vegetation am Seeufer oder in den sumpfigen Gebieten nahe des Sees vor, *B. choanomphala* im See und *B. pfeifferi* hauptsächlich in saisonalen Gewässern und überschwemmten Gebieten im Landesinneren [21–23,31–33]. Innerhalb der Gattung *Bulinus* stellen *Bulinus africanus*, *B. globosus* und *B. nasutus* die häufigsten Zwischenwirtarten für *S. haematobium* dar [23,24,33]. Alle *Biomphalaria*- und *Bulinus*- Arten sind Hermaphroditen und zur Selbst- oder gegenseitigen Befruchtung fähig [34,35]. Für die Reproduktion sind Temperaturen zwischen 22°C und 26°C optimal [25,36], *Bulinus*- Arten können aber auch Temperaturen zwischen etwa 10°C bis 35°C tolerieren [25]. Sechs bis acht Tage nach der Eiablage schlüpfen die jungen Schnecken und erreichen abhängig von der Art und den Umweltbedingungen ihre Reife innerhalb von vier bis sieben Wochen. Das Nahrungsangebot und die Temperatur sind hierbei die wichtigsten Faktoren. Die Lebensdauer der Schnecken kann mehr als ein Jahr betragen [25].

1.5 Pathogenese, Morbidität & Mortalität

Vier bis sechs Wochen nach der Erstinfektion kann die akute Form der Schistosomiasis (Katayama-Syndrom) als Folge der Migration und Reifung der Schistosomen, der Eiproduktion und der Freisetzung von Ei-Antigenen auftreten [1,10,14]. Typische Symptome sind Fieber, Kopfschmerzen, Husten, Übelkeit, Bauchschmerzen, Myalgien und ausgeprägte Eosinophilie, die mehrere Wochen andauern können [1].

Die chronische Schistosomiasis ist durch Abwehrreaktionen gegen gewebständige Eier bedingt. Ein Großteil der Eier wird nicht ausgeschieden, sondern verbleibt dauerhaft in Darm oder Leber (*S. mansoni*, *S. japonicum* und *S. mekongi*) bzw. in Harnblase und Urogenitalsystem (*S. haematobium*) [1]. Ei-antigene werden freigesetzt und lösen entzündliche Reaktionen und die Bildung von Granulomen aus [1,14,37]. Die adulten Würmer spielen hingegen kaum eine Rolle für die pathologischen Veränderungen [38]. Prinzipiell hängt die Schwere der Symptome sowohl von der Intensität der Infektion als auch von der individuellen Immunreaktion ab [14]. Bei etwa 10% der infizierten Personen treten schwere Krankheitsverläufe auf [39]. Gerade Kinder sind aufgrund *Schistosoma*-verursachter Anämien und Mangelernährung in ihrer Entwicklung beeinträchtigt [40]. Als Folge der anhaltenden Entzündungen zeigen sie ein verringertes Wachstum, eine verminderte körperliche Fitness sowie schlechtere kognitive und schulische Leistungen [41–43]. Bereits Kleinkinder sind der Gefahr einer Infektion durch die elterlichen Badepraktiken mit zerkarienhaltigem Wasser ausgesetzt [44,45]. Oftmals ist die Prävalenz dieser Altersgruppe ähnlich hoch wie bei Schulkindern [45] auch wenn geringere Infektionsintensitäten beobachtet werden [46]. In einer Studie in Ghana konnten Infektionen mit *S. haematobium* schon bei Säuglingen im Alter von

nur vier Monaten nachgewiesen werden [47], bei Untersuchungen in Uganda konnte ein durchschnittliches Alter von 17,8 Monaten für erstmals diagnostizierte Infektionen mit *S. mansoni* ermittelt werden [45]. Analysen im ländlichen Niger zeigten *S. haematobium*-Prävalenzen von 50,5–60,5% bei Kindern unter fünf Jahren und 55,6–72,2% bei ihren Müttern [44]. In der Regel treten die höchsten Prävalenzen und Infektionsintensitäten im Alter zwischen sechs und zwanzig Jahren auf und nehmen mit zunehmendem Alter wieder ab [1,48]. In mehreren Untersuchungen in endemischen Gebieten konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz bei Kindern im Schulalter höher war (60-80%) als bei Erwachsenen (20-40%) [49–51]. Diese Unterschiede sind auf mehrere Faktoren, wie z.B. der Entwicklung von Immunmechanismen gegen die Infektion und einer verringerten Exposition gegenüber zerkarienhaltigem Wasser mit zunehmendem Alter zurückzuführen [52–55].

Die Symptome der intestinalen Schistosomiasis können unspezifische intermittierende Unterleibsschmerzen, Durchfall und Rektalblutungen sein [56]. Im Verlauf der Erkrankung können sich fokale Fibrosen, Strikturen, Fisteln und papillomatöse Wucherungen im Darm ausbilden. Bei manchen Patienten führt die Erkrankung zu einer ausgeprägten Leberfibrose und nachfolgenden Hepatosplenomegalie mit Periportalfibrose [57]. Die hepatozellulären Funktionen bleiben dabei erhalten, was diese Ausprägung von der Leberzirrhose und anderen Lebererkrankungen unterscheidet [58]. Als Komplikation einer portalen Hypertonie können Aszites und Hämatemesis aufgrund von Ösophagusvarizen auftreten und schnell zum Tod führen [59]. Bei Patienten mit fortgeschrittener Leberfibrose kann zudem eine erhebliche pulmonale Hypertonie auftreten, die durch eine granulomatöse Lungenarteriitis verursacht wird. Die Entwicklung von der Erstinfektion zur fortgeschrittenen Fibrose dauert etwa fünf bis fünfzehn Jahre [60], Periportalfibrosen können jedoch schon bei Vorschulkindern auftreten [61].

Als Folge einer abnormalen Migration der Würmer und ins zentrale Nervensystem geschwemmte Eier, kann eine Neuro-Schistosomiasis entstehen. Hierbei kann es zu fokalen oder generalisierten Anfällen, Nystagmus, Kopfschmerzen, Rückenschmerzen und Muskelschwäche kommen [37].

Das Leitsymptom der durch *S. haematobium* verursachten urogenitalen Bilharziose ist die Hämaturie, die häufig mit einer gesteigerten Harnfrequenz, Brennen beim Harnlassen und suprapubischem Unbehagen auftritt [1]. Da die Hämaturie in endemischen Regionen sehr weit verbreitet ist, wird sie als natürliches Zeichen der Pubertät bei Jungen wahrgenommen und mit der Menstruation bei Mädchen verwechselt [62]. Als weitere mögliche urogenitale Symptome können Dysurie, Harnleiterstenose, Hydronephrose, Zystitis, Urethritis, Salpingitis, Prostatitis, Epididymitis und Hydrozele auftreten [63]. Während des chronischen Verlaufs der Erkrankung kann es zur Harnwegsfibrose und obstruktiven Uropathie kommen. Dies kann

durch bakterielle Superinfektion und Nierenfunktionsstörung zum Tod führen. Zu den weiteren Folgen des chronischen Verlaufs zählt das Plattenepithelkarzinom der Harnblase [63,64].

Bei der weiblichen genitalen Schistosomiasis können entzündliche Läsionen in den Eierstöcken, Eileitern, im Gebärmutterhals, in der Vagina und in der Vulva entstehen und zu Unfruchtbarkeit und einem erhöhten Risiko für Schwangerschaftsabbrüche führen [1]. Bei Männern kann sich die urogenitale Form mit Hämatospermie, Orchitis, Prostatitis, Dyspareunie und Oligospermie äußern [65]. Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen der urogenitalen Bilharziose und der HIV-Prävalenz festgestellt werden [66]. Das Risiko der HIV-Akquisition ist bei Frauen und Männern mit urogenitaler Schistosomiasis erhöht. Zudem kann die Schistosomiasis den Verlauf der HIV-Erkrankung beschleunigen und die Virusübertragung auf Sexualpartner erleichtern [67].

1.6 Schistosomiasis in Tansania

Bereits aus historischen Studien der 1920er Jahre geht hervor, dass damals die urogenitale und intestinale Bilharziose im Land endemisch war [21,31,68–70]. Die Schistosomiasis stellt nach wie vor ein großes Gesundheitsproblem dar und Tansania gehört heute zu den Ländern mit der höchsten Prävalenz [8]. Schätzungen zufolge sind 51,5% der 43,5 Millionen Einwohner von der Erkrankung betroffen [71] und die Prävalenz scheint mit zunehmender Bevölkerungszahl ebenfalls zu steigen (von 19% im Jahr 1977 auf etwa 51,5% im Jahr 2012) [31]. Die Verbreitung von *S. mansoni* und *S. haematobium* hängt vom Vorkommen der entsprechenden Zwischenwirte ab [72]. Schnecken der Gattung *Biomphalaria*, die als Zwischenwirt für *S. mansoni* fungieren, sind entlang des Ufers des Viktoriasees häufig zu finden [21]. Ebenso konnten hohe Prävalenzen von *S. mansoni* in Gemeinden ermittelt werden, die entlang des Seeufers oder auf den Inseln im Viktoriasee leben [31,32,73–75]. In einer Studie von Siza *et al.* [76] in der Region Mwanza, bei der die erwachsene Bevölkerung untersucht wurde, konnte insgesamt eine Prävalenz von *S. mansoni* von 18,9% ermittelt werden. Sehr hohe Prävalenzen wurden im Ilemela Distrikt (42,9%), Magu Distrikt (42%) und in Sengerema (51,1%) detektiert. Mit zunehmender Entfernung zum See nahm die Prävalenz der intestinalen Schistosomiasis ab, die Prävalenz der urogenitalen Bilharziose hingegen zu [76]. In einer weiteren Studie der selben Region wurde bei einem Drittel der untersuchten Dörfer Prävalenzen von *S. mansoni* von mehr als 50% gefunden [77]. *Schistosoma haematobium* ist insbesondere an der Ost- und Südostküste, auf den Inseln Unguja und Pemba (Sansibar) sowie in nordwestlichen Regionen des Landes endemisch [78]. Ebenso wie in anderen endemischen Ländern variiert in Tansania die Prävalenz und Infektionsintensität der Schistosomiasis je nach geographischer Region, dem Alter und Geschlecht [31].

1.7 Diagnose der Schistosomiasis

Die frühzeitige und genaue Diagnose der Schistosomiasis ist für das Patientenmanagement, die Beurteilung der Behandlungseffektivität und zur Überwachung von Kontrollprogrammen von entscheidender Bedeutung [79]. Je früher die Infektion nachgewiesen werden kann, desto eher kann eine entsprechende Behandlung erfolgen und damit zum Abbruch des Übertragungszyklus und zur Vermeidung chronischer Komplikationen führen. Es stehen verschiedene Diagnosemöglichkeiten zur Verfügung, die im Folgenden näher vorgestellt werden.

1.7.1 Parasitologische Methoden

Der Goldstandard für die Diagnose der Schistosomiasis ist seit Jahrzehnten der mikroskopische Nachweis von Eiern in Urin- oder Stuhlproben [80,81]. Durch die typische Größe, Form und besonderen Merkmale, wie z.B. dem lateralen Stachel bei *S. mansoni*, können die Eier leicht erkannt und identifiziert werden. Die Mikroskopie gilt als hochspezifisch, da detektierte *Schistosoma*-Eier einen direkten Beweis für eine Infektion liefern [80]. Die Methoden sind relativ einfach durchzuführen und kostengünstig, es wird jedoch geschultes Laborpersonal und Zugang zu einem Mikroskop benötigt [80,82]. Zum Nachweis von Infektionen mit *S. mansoni* wird in epidemiologischen Studien und zur Ermittlung der Behandlungseffizienz am häufigsten die Kato-Katz Methode verwendet [83]. Diese Technik ermöglicht neben dem Nachweis auch eine Quantifizierung der Infektion, welche durch das Zählen der Eier in einer definierten Menge Stuhl und anschließender Berechnung der Eier pro Gramm Stuhl (EPG) erfolgt. Ein Standard KK-Ausstrich, mit ca. 50 mg Stuhl hat somit eine Nachweisgrenze von 20 EPG Stuhl (1 Ei pro Objektträger) [80]. Die ermittelten Infektionsintensitäten können anhand der WHO-Klassifikation in leicht, mittel und schwer eingestuft werden [84] und als indirektes Maß für die Wurmlast und Morbidität verwendet werden [7]. Ein großer Nachteil der KK-Methode ist allerdings die geringe Sensitivität bei chronischen Infektionen oder Infektionen mit geringer Intensität [85,86]. Da die Eiausscheidung täglichen Schwankungen unterliegt und die Eier nicht gleichmäßig in der Stuhlprobe verteilt sind, steigt die Empfindlichkeit der Methode mit der Anzahl der analysierten Proben. Bei einigen Patienten können Proben von drei oder mehr aufeinanderfolgenden Tagen notwendig sein um eine Diagnose zu stellen [87–89]. Konzentrationstechniken wie die Formol-Ether- oder SAF-Technik können die Eier in der Probe anreichern und somit den Nachweis erleichtern, erfordern aber mehr Laborequipment- und Material und finden daher in ressourcenarmen Umgebungen meist keine Anwendung [90–92].

Der Nachweis der Eier von *S. haematobium* erfolgt ebenfalls mikroskopisch. Die Eier werden im Urin ausgeschieden und können nach der Konzentration der Probe durch Sedimentation, Zentrifugation oder Filtration gut nachgewiesen werden. Am weitesten verbreitet ist die

Methode der *Nucleopore* Membranfilter-Technik [80], bei der eine definierte Menge Urin (meist 10 ml) mithilfe einer Spritze und einem vorgeschalteten Filterhalter durch einen Nylon-Filter (12-20 µm Porengröße) gefiltert wird. Falls Eier von *S. haematobium* vorhanden sind (Größe 150 x 60 µm), können diese den Filter nicht passieren und verbleiben auf der Filteroberfläche. Bei mikroskopischer Betrachtung des Filters können die Eier identifiziert und quantifiziert werden [93,94].

Die mikroskopischen Nachweisverfahren eignen sich jedoch nicht zur Diagnose der akuten Schistosomiasis, da die Eiablage erst vier bis sechs Wochen nach der Infektion beginnt [80,95].

1.7.2 Immundiagnostische Verfahren

Der Nachweis von Antikörpern gegen schistosomale Antigene ist ein wichtiges Verfahren zur Diagnose von Infektionen in Gebieten mit geringer Endemie, bei Kindern mit anfänglicher aktiver Infektion und bei Reisenden, die aus endemischen Gebieten zurückkehren [96,97]. Die eingesetzten Tests sind sehr empfindlich, lassen jedoch keine Unterscheidung zwischen aktueller und früherer Erkrankung zu, da die Antikörpertiter noch Monate bis Jahre nach erfolgreicher Heilung der Infektion persistieren können [80,98]. Daher ist die Verwendung serologischer Verfahren in hochendemischen Gebieten, in denen der Großteil der Bevölkerung bereits Kontakt mit Schistosome hatte und zur Kontrolle der Therapie, von geringem Wert [1]. Darüber hinaus können Kreuzreaktionen mit anderen Helminthen auftreten, was die Testspezifität deutlich verringert [99]. Um die Sensitivität und Spezifität zu erhöhen, können verschiedene serologische Tests und / oder verschiedene Antigene kombiniert werden [100]. Am weitesten verbreitet sind ELISA-Techniken, Immunfluoreszenz-Antikörper-Tests (IFAT) und Agglutinationstests bei denen Antigene oder Schnittpräparate verschiedener Parasitenstadien eingesetzt werden, um spezifische IgG-Antikörper zu detektieren [90,101,102].

Eine weitere Möglichkeit zur Diagnose der Schistosomiasis ist der Nachweis von Antigenen des Parasiten im Blut oder Urin von Patienten. Die am besten untersuchten Antigene sind das zirkulierende kathodische Antigen (CCA) und zirkulierende anodische Antigen (CAA). Ein kommerzieller *Point-of-Care* Kassettentest, der CCA in Urinproben detektiert (POC-CCA-Test), ist seit mehr als 10 Jahren verfügbar [103]. Er ist unter Feldbedingungen einfach anzuwenden und seine Performance wurde in zahlreichen Studien untersucht. Coulibaly *et al.* [46] konnte in einer Studie mit Kleinkindern zeigen, dass ein einzelner POC-CCA-Test sensitiver war als mehrfach durchgeführte KK-Untersuchungen, sowohl vor als auch 3 Wochen nach der Behandlung mit Praziquantel. Darüber hinaus erlaubte die Intensität der positiven Testbande Rückschlüsse auf die Intensität der Infektion [46,90]. Prinzipiell ist CCA bei allen *Schistosoma*-Spezies nachweisbar, die Sensitivität unterscheidet

sich jedoch zwischen den Arten. Die höchsten CCA-Konzentrationen finden sich bei *S. mansoni*-Infektionen, weshalb der Test besonders gut für die Diagnose der intestinalen Schistosomiasis geeignet ist [104]. In Versuchen mit Pavianen konnte gezeigt werden, dass der Schnelltest ab einer Infektion mit ca. 50 Würmern positive Testergebnisse ausgibt [105]. Die Sensitivität des POC-CCA-Tests ist stark mit der Infektionsintensität korreliert [106] und leichte Infektionen werden oft als negativ detektiert [107]. Darüber hinaus können falsch positive Ergebnisse auftreten [87]. Nichtsdestotrotz ist der Nachweis von CCA in Urin ein schneller und einfacher Weg zur Identifizierung einer aktiven Schistosomiasis, nicht-invasiv und in epidemiologischen Studien gut einsetzbar.

Zum Nachweis von CAA im Serum wurde eine hochempfindliche sogenannte *up-converting phosphor* (UCP)-Technologie in Kombination mit einem *lateral flow assay* (LF) (UCP-LF CAA-Test) entwickelt. Zur Testdurchführung ist ein Probenvorbereitungsschritt notwendig, für den eine gewisse Laborausstattung notwendig ist. Darüber hinaus beinhaltet der Tests auch einen Konzentrationsschritt, der die Sensitivität erhöht, indem er die Analyse eines erhöhten Probenvolumens ermöglicht [108,109]. Bereits vier Wochen nach der Exposition konnten positive CAA-Werte gemessen werden, teilweise noch bevor die *Schistosoma*-spezifischen Antikörper positiv wurden [109]. Der UCP-LF CAA-Test ist ein gattungsspezifischer Test, der Infektionen aller *Schistosoma*-Arten nachweisen kann [109]. Dieses Verfahren erzielte bereits in mehreren Studien vielversprechende Ergebnisse und scheint auch zum Nachweis leichter Infektionen hochsensitiv zu sein [109–111]. Weiterhin zeigte eine Studie von Corstjens *et al.* [108], dass das UCP-LF-Format auch für den Nachweis von CAA im Urin verwendet werden kann. Kommerziell ist dieser Test noch nicht verfügbar.

1.7.3 Indirekte Diagnoseverfahren

In einer Meta-Analyse von King und Bertsch [112] konnte gezeigt werden, dass Urinteststreifen für die schnelle Erkennung von Hämaturie im Urin, einen wirksamen Marker für den Nachweis einer Blasenbilharziose bei Patienten in endemischen Gebieten darstellen [112]. Insgesamt konnte eine Sensitivität von 81% und eine Spezifität von 89% für den Nachweis von Ei-positiven Urinen ermittelt werden [112]. Eine Kontamination der Urinprobe mit Blut durch Menstruation, bakterielle Blasenentzündungen oder sexuell übertragbare Infektionen können zu falsch negativen Ergebnissen führen [113,114]. Um die Sensitivität und Spezifität zu verbessern, wird empfohlen zusätzlich zur Hämaturie das Vorliegen einer Proteinurie und Leukozyturie zu überprüfen [115]. Bei der intestinalen Bilharziose sind die indirekten Marker nicht so eindeutig, gerade bei Symptomen wie blutigen Durchfällen müssen auch andere Ursachen ausgeschlossen werden [80]. In endemischen Regionen für *S. mansoni* und *S. japonicum* häufig auftretende Symptome sind Hepatosplenomegalie und Splenomegalie, welche klinisch durch Tastuntersuchungen nachgewiesen werden können [80].

Als weitere indirekte Methode spielt die Ultraschalluntersuchung eine wichtige Rolle bei der Diagnose der hepatosplenischen und urogenitalen Schistosomiasis. Sie hat sich als sichere, schnelle, nicht-invasive und relativ kostengünstige Technik zur Beurteilung von Bilharziose bedingten Organveränderungen etabliert. Allerdings hängt die Interpretation des Ultraschallbildes von der Erfahrung des Untersuchers ab und ist möglicherweise nicht dazu geeignet, frühe Veränderungen der betroffenen Organe zu erkennen [116]. Durch die Bildgebung können beispielsweise periportale Fibrosen, Splenomegalie und das Vorhandensein von Kollateralgefäßen detektiert werden. Darüber hinaus kann der Grad der periportal Fibrose mithilfe der Sonographie durch Messung der Pfortaderdicke bestimmt werden [117]. Ultraschalluntersuchungen stellen ein gutes Instrument zur Messung der Morbidität dar und bieten zudem die Möglichkeit die Entwicklung pathologischer Veränderungen nach der Behandlung zu visualisieren [116].

1.7.4 Molekulare Methoden

Eine sehr spezifische und hochempfindliche Methode zur Diagnose der Schistosomiasis ist der Nachweis *Schistosoma* spezifischer DNA in Serum, Plasma, Urin oder Stuhl mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [87,90,99]. Der Schlüsselschritt bei DNA-basierten Diagnosemethoden ist die DNA-Extraktion, da sich die Ausbeute und Qualität der DNA direkt auf das Ergebnis des Amplifikationsverfahrens auswirken [79]. Häufig wird hierzu die biochemische Phenol-Chloroform-Extraktion angewendet. Da das Verfahren sehr zeitaufwändig ist und zudem toxische und mutagene Komponenten enthält [118], wird immer häufiger auf kommerzielle Extraktionskits zurückgegriffen. Diese Kits sind für verschiedene Anwendungsbereiche und Probenmaterialien optimiert, ermöglichen eine schnelle DNA-Extraktion und zeigen gute Ergebnisse hinsichtlich Qualität und Quantität der extrahierten DNA [119]. In zahlreichen Studien wurden verschiedene DNA-Amplifikationsassays unter Verwendung verschiedener klinischer Proben getestet, u.a. die Methode der klassischen PCR, Real-Time PCR und LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) [120–127]. Der Vorteil der Real-Time PCR besteht in der Möglichkeit der Quantifizierung des Zielgens mithilfe fluoreszierender Farbstoffe, deren Signalstärke direkt proportional zur Anzahl der amplifizierten DNA-Moleküle ist. Hierfür ist jedoch ein entsprechendes Real-Time PCR Gerät notwendig. Die isothermale LAMP-Methode ist hingegen eine einfache und schnelle Technik, die ohne Thermocycler durchgeführt werden kann. Unter Verwendung von sechs Primern wird die DNA-Zielsequenz unter einer gleichbleibenden Temperatur (60-65°C) innerhalb einer Stunde vervielfältigt [128]. Das Ergebnis dieser Amplifikationsreaktion kann für das bloße Auge sichtbar gemacht werden. Ein häufiges Problem dieses Verfahrens ist allerdings durch Kontamination verursachte falsch positive Ergebnisse [79].

Bei Verwendung von Urinproben (*S. haematobium*) oder Stuhlproben (*S. mansoni* und weitere Erreger der intestinalen Schistosomiasis) wird hauptsächlich aus Eiern stammende DNA nachgewiesen. Diese Verfahren sind sensitiver als die mikroskopischen Analysen, unterliegen jedoch auch dem Problem der unregelmäßigen Ausscheidung und Verteilung der Eier in den Probenmaterialien [129]. Eine Alternative stellt der Nachweis von sogenannter zellfreier Parasiten-DNA (*cell-free parasite DNA* - CFPD) dar. Hierbei handelt es sich um DNA aus Zellen oder Zellfragmenten, die von adulten Würmern, Larvenstadien oder Eiern abgegeben werden [126]. Die CFPD liegt im Serum/Plasma gleichmäßig verteilt vor [79] und ermöglicht nach der Infektion eine sehr frühe Diagnose [126]. In Versuchsreihen mit Hamstern konnte gezeigt werden, dass *S. mansoni*-spezifische DNA im Serum bereits 14 Tage nach der Infektion nachweisbar war [122].

Die Nachteile der molekularen Nachweismethoden sind die hohen Kosten für Geräte, Reagenzien bzw. Testkits und der Bedarf an gut ausgebildetem Laborpersonal [130]. Trotzdem kann die PCR ein nützliches zusätzliches Instrument zur frühen Diagnose, zur Bestätigung serologischer Tests, zur Überprüfung der klassischen Methoden oder zum Nachweis von *Schistosoma*-Infektionen mit geringer Intensität sein [123].

1.7.5 Untersuchung des Zwischenwirtes

Neben der Diagnose von aktiven *Schistosoma*-Infektion bei der humanen Bevölkerung, kann der Nachweis von Infektionen im Zwischenwirt ebenfalls wichtige Informationen für das Monitoring und die Bewertung von Kontroll- und Eliminierungsprogrammen liefern. Eine Möglichkeit zur Identifizierung kontaminierter Habitats in der Umwelt ist die Xenodiagnose von Schnecken, beispielsweise durch die Überprüfung dort gesammelter Schnecken oder ausgesetzter Sentinel-Schnecken [131]. Patente Infektionen können durch den sogenannten *cercarial-shedding test* nachgewiesen werden. Dieser beruht auf einem lichtinduzierten Ausstoß von Zerkarien aus den Schnecken, die anschließend mikroskopisch identifiziert werden können [132]. Präpatente Infektionen können durch histologische Untersuchung von Schneckengewebe oder durch PCR-Verfahren nachgewiesen werden [133,134]

1.8 Behandlung

Zur Behandlung der Schistosomiasis ist das Medikament Praziquantel das Mittel der Wahl. Es kann zur Behandlung aller humanpathogenen Arten von *Schistosoma* eingesetzt werden [135], was insbesondere in Regionen wo mehrere Arten gleichzeitig vorkommen können, ein bedeutendes Merkmal ist [136]. In epidemiologischen Studien wurden mit diesem Arzneimittel Heilungsraten von 60-90% erzielt [135,137–139]. Bei nicht vollständig ausgeheilten Personen zeigte sich zumindest eine deutlich verminderte Eiausscheidung, was die Ausbildung von Langzeitfolgen stark vermindert [135]. Die empfohlene Dosis zur Therapie von Infektionen mit *S. haematobium* und *S. mansoni* beträgt 40 mg/kg Körpergewicht und kann in der

Schwangerschaft nach dem ersten Trimester sicher angewendet werden. Zur Behandlung von Infektionen mit *S. japonicum* und *S. mekongi* wird eine höhere Dosis von 60 mg/kg Körpergewicht empfohlen [135,140]. Durch die Größe der Tabletten und den bitteren Geschmack gestaltet sich die Behandlung von Kleinkindern (jünger als fünf Jahre) schwierig. Deshalb erfolgt die Therapie meist über zerkleinerte und in z.B. Orangensaft aufgelöste Tabletten. Die bei kleinen Kindern erzielten Heilungsraten sind jedoch geringer als bei anderen Altersgruppen, was möglicherweise durch eine falsche Extrapolation der Erwachsenenendosierung verursacht sein könnte [141]. Eine leicht anzuwendende, pädiatrische Formulierung (Schmelztablette) befindet sich derzeit in der klinischen Prüfung [142].

Das Medikament PZQ ist gut verträglich und verursacht nur leichte Nebenwirkungen. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen, Unwohlsein und Schwindel. Bei schweren Infektionen können etwa zwei bis vier Stunden nach der Einnahme des Arzneimittels intensive Koliken und blutige Durchfälle auftreten. Möglicherweise ist dies auf die Antigenfreisetzung und die Abschwemmung der abgestorbenen „Wurmmasse“ zurückzuführen [14]. Der Wirkmechanismus von PZQ ist auf molekularer Ebene noch nicht vollständig geklärt. Laboruntersuchungen haben gezeigt, dass das Medikament zu krampfartigen Kontraktionen der Muskulatur der Parasiten führt und Vakuolen im Tegument gebildet werden, wodurch sich die Trematoden von den Venenwänden lösen und sterben. Es wird angenommen, dass die Muskelkontraktion und Tegumentschädigung auf eine Störung der Kalziumhomöostase in den Würmern zurückgehen. Daher wurden die Kalzium-Ionenkanäle der Schistosomen indirekt als molekulares Ziel von PZQ identifiziert [88]. Die Effizienz von PZQ hängt vom Alter der Infektion ab. Es ist erst ca. sechs bis sieben Wochen nach der erworbenen Infektion hoch wirksam [143,144]. Die Wirkung bezieht sich demzufolge hauptsächlich auf die adulten Würmer, aber nicht auf die juvenilen Stadien [145]. Das bedeutet eine unvollständige Heilung der Menschen, die zum Zeitpunkt der Behandlung unreife Schistosomen in sich tragen, welche daraufhin zu adulten Parasiten heranreifen können [146]. Dagegen sind einige Malariamedikamente, wie Artemisinin-Derivate (Artemether und Artesunat) und Mefloquin wirksam gegen juvenilen Stadien aber weniger effektiv gegen adulte Schistosomen [147,148]. Durch eine systematische Überprüfung und Metaanalyse konnten Perez del Villar *et al.* [146] demonstrieren, dass die Kombination aus Artemisininderivaten und PZQ zu doppelt so hohen Heilungsraten führte als die alleinige Gabe von PZQ. Bedacht werden sollte allerdings, dass durch die Anwendung von Artemisinin in Massenbehandlungsprogrammen gegen Schistosomiasis auch die Möglichkeit des Auftretens von Artemisinin-resistenter Malaria begünstigt werden könnte [146]. Für eine Resistenzentwicklung auf PZQ gibt es auch nach dem intensiven Einsatz in vielen endemischen Ländern keine eindeutigen Beweise. Experimentell konnten jedoch Resistenzen induziert werden, sodass die Gefahr einer durch Massenbehandlung hervorgerufenen

Resistenz bestehen bleibt und hinsichtlich neuer antischistosomalere Wirkstoffe geforscht werden sollte [149].

Praziquantel ist aufgrund seiner hervorragenden Verträglichkeit und der guten Wirksamkeit hervorragend zur Verabreichung in jährlichen Massenbehandlungsprogrammen geeignet. Es kann neben Gesundheitspersonal auch von z.B. geschulten Lehrern verabreicht werden, um eine möglichst große Reichweite zu erzielen. Auch wenn häufig schnelle Reinfektionen auftreten, führt die Behandlung zur Senkung der Morbidität und vermindert damit Langzeitfolgen der intestinalen und urogenitalen Schistosomiasis [150].

1.9 Prävention & Kontrolle

Zur Prävention und Kontrolle der Schistosomiasis ist das Verständnis des komplexen Lebenszyklus und der damit verbundenen Zirkulation des Parasiten zwischen Süßwasserschnecken und Menschen von entscheidender Bedeutung [1]. Zur Bekämpfung der Erkrankung müssen sektorübergreifende Maßnahmen, die Umwelt-, Verhaltens-, Parasiten-, Vektor- und Wirtsfaktoren umfassen, durchgeführt werden [38]. Zwar wurde einerseits in mehreren Studien gezeigt, dass eine jährliche Massenbehandlung mit PZQ zu einer signifikanten Reduktion der Prävalenz und Morbidität führt [151,152], andererseits wurde festgestellt, dass trotz einiger jährlicher Behandlungsrunden in Subsahara-Afrika, die Prävalenz der Schistosomiasis in vielen Regionen nach wie vor sehr hoch ist [8,153]. Praziquantel stellt zwar das Rückgrat von Kontrollprogrammen dar, kann aber als einzelnes Instrument, ohne andere flankierende Maßnahmen, die Transmission in Hochprävalenzregionen nicht unterbrechen [154,155]. Es ist nicht 100% wirksam gegen adulte *Schistosoma*, kann juvenile Stadien nicht abtöten und wirkt nicht präventiv gegen Reinfektionen [156]. Ein weiteres Problem stellt der unzureichende Abdeckungsgrad mit dem Arzneimittel dar [157]. Im Jahr 2018 wurde eine globale Abdeckung von lediglich 41,6% gemeldet [158]. Praziquantel wird zwar oft kostenfrei zur Verfügung gestellt, aber Mittel für den Transport, vor allem auch in entlegene Regionen und die sichere Verabreichung unter medizinischer Kontrolle sind nur selten gewährleistet [157]. Zudem wurde in vielen Ländern über eine geringe *Compliance*-Rate berichtet (< 50%) [159]. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Angst der Patienten vor Nebenwirkungen durch die Medikamenteneinnahme sein. Berichten zufolge erleiden bis zu 80% der Teilnehmer von Behandlungskampagnen vorübergehende Nebenwirkungen wie Schwindel, Ohnmacht, Erbrechen und Durchfall [160]. Des Weiteren besteht bei den Patienten der Wunsch nach individueller Diagnose, um festzustellen, ob überhaupt eine Infektion mit *Schistosoma* vorliegt, bevor entsprechende Medikamente verabreicht werden [157]. Um einerseits die Teilnahmebereitschaft in der Bevölkerung zu erhöhen, andererseits aber auch Einfluss auf das Risikoverhalten (Kontamination von Gewässern, Kontakt zu zerkarienhaltigem Wasser) zu nehmen, ist das

Verständnis über die Krankheit von zentraler Bedeutung [157]. Um den Lebenszyklus des Parasiten langfristig zu durchbrechen sind aber ebenso Maßnahmen zur Verbesserung der Wasserversorgung (z.B. Wasserqualität, Wassermenge und Entfernung zum Wasser), der Sanitärversorgung (z.B. Zugang zu verbesserten Latrinen, Latrinenwartung) und Hygienepraktiken (z.B. persönliche Hygiene, Wasseraufbereitung- und Lagerung) erforderlich [1,157]. In den ersten 60 Jahren der Bekämpfung der Schistosomiasis, als es noch keine Medikamente für Massenbehandlungsprogramm gab, war die Schneckenkontrolle die primäre Methode, um die Transmission zu verhindern. Dazu wurde hauptsächlich das chemische Molluskizid Niclosamid verwendet, obwohl es auch Versuche bezüglich Habitatveränderungen, biologischen Konkurrenten und Räubern der Schnecken gab [161]. Aufgrund der hohen Kosten, der Toxizität, der Umweltkontamination und der möglichen Resistenzentwicklung der Schnecken gegen chemische Molluskizide, sind diese für die Langzeiteindämmung der Krankheit ungeeignet [162]. Die Forschung bewegt sich in Richtung natürlicher Molluskizide, da viele Pflanzen potenzielle Wirkstoffe enthalten, die umweltfreundlich und weniger toxisch sind [163].

Die Kontrolle der Schistosomiasis erfordert die integrierte Anwendung aller genannten Methoden: Diagnostik, präventive Chemotherapie, Aufklärung und Gesundheitserziehung, Verhaltensänderung, Verbesserung der Wasser- und Sanitärversorgung, Schneckenkontrolle und vielleicht irgendwann ein prophylaktischer oder übertragungshemmender Impfstoff [1,38,157].

2. Problemstellung & Zielsetzung

Die exakte Diagnose der Schistosomiasis ist für die Prävention und Kontrolle der Erkrankung von entscheidender Bedeutung [164]. Sie ermöglicht eine frühzeitige Behandlung und verhindert dadurch die Entstehung chronischer Komplikationen. Darüber hinaus ist eine präzise Diagnostik zur Überwachung von Eliminationsprogrammen, bei der Arzneimittelenwicklung und Impfstoffbewertung wichtig, da hier der Infektionsstatus über einen längeren Zeitraum hinweg beobachtet werden muss [1]. Es stehen zwar verschiedene parasitologische und immunologische Verfahren zur Diagnose der Schistosomiasis zur Verfügung, diese sind jedoch in Abhängigkeit der jeweiligen Anwendungssituation nur bedingt geeignet und weisen zum Teil nur geringe Sensitivitäten auf. Die WHO empfiehlt in Behandlungsprogrammen den mikroskopischen Nachweis der Eier im Stuhl oder Urin aufgrund der einfachen Handhabung im Feld [164,165]. Diese klassischen Methoden liefern in Regionen mit hoher Prävalenz und Infektionsintensitäten zuverlässige Ergebnisse, leichte Infektionen werden dagegen häufig nicht erkannt und führen zu Fehldiagnosen. Zudem sind parasitologische Verfahren erst nach Ablauf der Präpatenzzeit anwendbar, da zuvor keine Eier produziert und ausgeschieden werden. Immundiagnostische Methoden können hier eine gute Alternative darstellen. Die Anwendung serologischer Tests ist allerdings in endemischen Gebieten nicht sinnvoll, da die Antikörper auch nach erfolgreicher Therapie noch lange im Körper persistieren können und somit eine Unterscheidung zwischen einer aktuellen und vergangenen Infektion nicht zulässt [166,167]. Aufgrund der einfachen und schnellen Anwendbarkeit des POC-CCA Schnelltests, wird dieser häufig in epidemiologischen Studien zur Diagnose aktiver Infektionen eingesetzt. Allerdings ist die Sensitivität, vor allen in Gebieten mit niedriger Prävalenz, nur moderat und durch mögliche Kreuzreaktionen mit anderen Helmintheninfektionen sind falsch positive Ergebnisse möglich [87]. Hochsensitive Tests sind notwendig, um akute Infektionen, Infektionen mit geringer Intensität und Therapieversager diagnostizieren zu können. Als geeignetes Instrument für diese Anwendungsbereiche wurde der molekulare Nachweis parasitärer DNA mittels PCR-Methoden erkannt [168]. Frei zirkulierende DNA-Fragmente werden von Parasiten in verschiedene Körperflüssigkeiten freigesetzt und können hier durch PCR-Analysen nachgewiesen werden [52,169]. Gerade zur Diagnose leichter Infektionen haben sich DNA-Nachweistests als deutlich überlegen erwiesen [52]. Das Ergebnis molekularer Nachweismethoden hängt allerdings direkt von der Quantität und Qualität des eingesetzten DNA-Templates ab. Von daher spielen die Art der Probe, die Probenkonservierung, die Probenlagerung sowie die DNA-Extraktion aus diesen Proben eine zentrale Rolle. Die erstrebenswerteste Probe wäre Urin, da dieser leicht verfügbar ist, die Probensammlung nicht invasiv ist und Urinproben leicht in Schulen und Kliniken gesammelt werden können. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von *dried blood spots* (DBSs), da hier lediglich Blut aus der Fingerbeere entnommen werden muss und keine

Venenblutentnahme notwendig ist. Zurzeit liegen jedoch nur begrenzte Daten zur Verwendung verschiedener klinischer Probenmaterialien im Vergleich vor. Ob die Methode der Real-Time PCR aufgrund der Möglichkeit der quantitativen Analyse, zur Überprüfung des Therapieerfolges verwendet werden kann, wurde ebenfalls noch nicht hinreichend untersucht. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit die diagnostische Leistung der Real-Time PCR zum Nachweis von *S. mansoni* spezifischer DNA in Stuhl,- Urin- und Blutproben mit den Ergebnissen des KK-Verfahrens und des POC-CCA-Tests zu vergleichen. Darüber hinaus wurden verschiedene Arten der Probenkonservierung getestet. Des Weiteren wurde die serumbasierte Real-Time PCR-Methode genutzt, um den Verlauf der DNA vor und nach der Behandlung mit PZQ zu beobachten und damit grundlegende Daten für die Überprüfung der Therapie zu generieren. Zur Beurteilung der Wirksamkeit von PZQ ist ein präzises Diagnoseinstrument notwendig, da eine geringe Anzahl überlebender Parasiten die Unterbrechung der Transmission verhindert und damit den Erfolg von Bekämpfungsmaßnahmen zunichte machen kann. Deshalb sind empfindlichere Nachweisverfahren sowohl im klinischen Umfeld für frühe Diagnosen als auch in epidemiologischen Studien, insbesondere in Eliminationsphasen, erforderlich.

Zum Verständnis der Epidemiologie und Kontrolle der Krankheit sind ebenfalls Kenntnisse über die Zwischenwirte, deren Verbreitung und Lebensraumpräferenz entscheidend [170]. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb malakologische Studien im Rahmen des Pilotprojektes „*Proof of concept study on sustainable schistosomiasis elimination through an integrated community based approach on Ijinga Island, Mwanza, Northwestern Tanzania*“ durchgeführt. Das Ziel dieses 5-jährigen Projektes ist eine nachhaltige Kontrolle der Erkrankung Schistosomiasis durch einen multidisziplinären Ansatz zu bewirken. Folgende Maßnahmen stehen dabei im Vordergrund:

1. Intensiviertes Therapieprogramm, das wiederholte Behandlungen aller Inselbewohner (sowohl Erwachsene als auch Kinder) vorsieht
2. Mehrfache Gesundheitsaufklärung um das Bewusstsein für die Schistosomiasis und den damit verbundenen schwerwiegenden Komplikationen zu schärfen und dadurch zu Verhaltensänderungen beizutragen
3. Verbesserung der Wasser- und Sanitärversorgung

Die Hauptziele der malakologischen Analysen war Transmissions-Hotspots in den Ufergebieten der Insel Ijinga zu identifizieren und zu überprüfen, ob die Analyse der Zwischenwirte als Monitoring-Tool für die Effektivität der durchgeführten Behandlungskampagnen der Inselbewohner verwendet werden kann.

Folgende konkrete Ziele wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation bearbeitet:

1. Untersuchungen anhand humaner Proben:

- Performance des Nachweises von *S. mansoni* DNA in Stuhlproben mittels Real-Time PCR im Vergleich zum mikroskopischen KK-Verfahren und urinbasiertem POC-CCA-Schnelltest
- Verwendung von Serum, Urin oder DBSs für die Diagnose der durch *S. mansoni* verursachten Schistosomiasis mittels Real-Time PCR im Vergleich zu den klassischen Methoden
- Verwendung der serumbasierten Real-Time PCR zum Nachweis von *S. mansoni* DNA vor und nach Behandlung mit Praziquantel
- Performance der KK-Methode, des POC-CCA-Tests und der serumbasierten Real-Time PCR in Abhängigkeit vom HIV-Status

2. Malakologische Untersuchungen auf der Insel Ijinga:

- Identifizierung der Zwischenwirtschnecken in der Studienregion
- Identifizierung von Transmissions-Hotspots via Real-Time PCR-Analysen der Schnecken hinsichtlich Infektionen mit *S. mansoni*
- Korrelation der Schneckenhäufigkeit mit physikochemischen Wasserwerten, biotischen Faktoren und Wasserkontaktverhalten der Inselbevölkerung
- Spiegeln sich Prävalenzveränderungen von *S. mansoni* in der menschlichen Bevölkerung durch die Behandlung mit PZQ im Zwischenwirt wieder und können Untersuchungen der Süßwasserschnecken demzufolge zur Beurteilung von Kontrollmaßnahmen verwendet werden?

3. Material & Methoden

3.1 Studienorte und Studienteilnehmer

Mwanza ist die zweitgrößte Stadt Tansanias und liegt direkt am Ufer des Viktoriasees im Nordwesten des Landes. Bei der letzten Volkszählung 2012 wurden 706.453 Einwohner registriert [171]. Mwanza ist die Hauptstadt der gleichnamigen Region Mwanza, welche in sieben Distrikte unterteilt ist: Ilemela, Kwimba, Magu, Misungwi, Nyamagana, Sengerema und Ukerewe [172]. Schätzungen zufolge leben etwa eine Mio. Menschen dieser Region in Ufernähe des Viktoriasees und damit in den Gebieten, die die höchste Prävalenz von *S. mansoni* aufweisen [173]. Die Region ist durch ein tropisches Klima mit zwei Regenzeiten gekennzeichnet, einer kurzen Regenzeit von Oktober bis Dezember und einer langen Regenzeit von März bis Mai. Der jährliche Niederschlag beträgt im Durchschnitt 1.200 mm und die durchschnittliche Jahrestemperatur beträgt 26,5°C.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Querschnittsstudie zur Real-Time PCR-Diagnostik aus Stuhlproben wurde im März 2015 in einer Schule in Kayenze (Ilemela Distrikt) bzw. in einer Schule in Chabula (Magu Distrikt) durchgeführt. Das Studienkollektiv setzte sich aus 305 Schulkindern im Alter von 7-16 Jahren zusammen. Beide Schulen befanden sich in unmittelbarer Nähe zum See.

Die Studien zur Validierung der Real-Time PCR-Methode aus verschiedenen humanen Probenmaterialien bzw. zur Therapiekontrolle wurden im März bzw. Juli 2018 ebenfalls in der Gemeinde Kayenze, am Südufer des Viktoriasees durchgeführt. Da hier neben Stuhl- und Urinproben auch mehrfache Blutabnahmen erforderlich waren, wurden in die Studien nur erwachsene Teilnehmer zwischen 17 und 70 Jahre eingeschlossen. Eine in den letzten zwölf Monaten erhaltene Behandlung mit PZQ galt als Ausschlusskriterium für die Partizipation. Die Mehrheit der in Kayenze lebenden Bevölkerung ist vom See abhängig um ihren täglichen Wasserbedarf zu decken (Trinken, Kochen, Baden, Geschirr und Wäsche waschen usw.) bzw. um ihren beruflichen Aktivitäten, wie der Fischerei oder Landwirtschaft nachzugehen. Die Region ist endemisch für *S. mansoni* [174–176] und die Intensität der Infektion durch den häufigen beruflichen Wasserkontakt auch im Erwachsenenalter hoch [75]. Jährliche Massenbehandlungen mit den Medikamenten PZQ und Albendazol gegen Helmintheninfektionen finden nur innerhalb der Schulen statt, jedoch nicht in der erwachsenen Bevölkerung [174].

Die Pilotstudie zur Elimination der Schistosomiasis und die innerhalb dieses Projektes durchgeführten malakologischen Untersuchungen fanden auf der Insel Ijinga statt. Die Insel liegt im Viktoriasee unweit des Festlands und gehört zum Magu Distrikt. Im Dezember 2016 wurde innerhalb des Eliminationsprojektes eine permanente Einwohnerzahl von 1.850 ermittelt

(Zählung von Haus zu Haus). Die Inselgemeinde besteht aus den fünf Dörfern Kashishi, Mwamalangale, Ngambaji, Ilago und Igadi. Subsistenzlandwirtschaft, Fischerei und Viehzucht bilden die Existenzgrundlage der meisten Bewohner. Da zu Projektbeginn nur der See als Wasserquelle zur Verfügung stand, wurde das Seewasser permanent als Hauptwasserquelle für den Hausgebrauch, zur landwirtschaftlichen Bewässerung etc. verwendet. Die Projektziele umfassen neben einer Verbesserung der Wasser- und Sanitärversorgung auch eine Reduzierung der Prävalenz mithilfe eines intensivierten Behandlungsprotokolls der gesamten Bevölkerung. Dazu wurden von März 2017 bis Dezember 2017 vier Behandlungsrunden mit PZQ durchgeführt, wobei alle Altersgruppen einbezogen wurden. Die ersten drei Behandlungen wurden im monatlichen Abstand durchgeführt, die vierte Medikation folgte ein viertel Jahr später. Um den Verlauf der Prävalenz nach den jeweiligen Behandlungen überprüfen zu können, wurden regelmäßige Untersuchungen einer Sentinelgruppe durchgeführt. Diese bestand aus 223 Schulkindern, welche jeweils nach der Chemotherapie bzw. nach der vierteljährigen Behandlungspause mittels der KK-Methode überwacht wurden.

3.2 Ethik und Zustimmung zur Teilnahme

Alle Studienteilnehmer wurden umfassend über die jeweiligen Studien informiert und haben eine schriftliche Einverständniserklärung (in Suaheli übersetzt) unterschrieben. Bei Minderjährigen wurde die schriftliche Einwilligung durch die Eltern oder gesetzlichen Vertreter erteilt. Bei Analphabeten wurde ein Fingerabdruck als „Unterschrift“ der Einwilligungserklärung verwendet, nachdem eine klare mündliche Beschreibung der Studieninhalte erfolgt war. Die Teilnahme war stets freiwillig und kostenlos. Alle Studienteilnehmer, bei denen eine Schistosomiasis durch die mikroskopischen Untersuchungen oder den POC-CCA-Test diagnostiziert wurden, wurden mit Praziquantel (WHO empfohlene klinische Dosis: 40 mg/kg Körpergewicht) behandelt.

Für alle Studien wurden Ethikanträge gestellt und wie nachfolgend aufgeführt, genehmigt:

- Die Studie „Comparison of sensitivity and specificity of three diagnostic tests to detect *Schistosoma mansoni* infections in school children in Mwanza region, Tanzania“ wurde von der Ethikkommission der Catholic University of Health and Allied Sciences (CUHAS), Mwanza, Tanzania, unter dem Titel „Pilot study to evaluate the sensitivity of a modified technique of *Schistosoma* CCA detection in urine“ geprüft und genehmigt (Zertifikat-Nr. CREC/062/2014).
- Die Studie „Diagnostic accuracy and applicability of molecular approaches for the detection of schistosome DNA in human blood and urine samples pre- and post-treatment“ wurde sowohl von der Ethikkommission der CUHAS Universität, Mwanza, Tanzania (Zertifikat-Nr. CREC/243/2017) als auch vom National Institute for Medical

Research (NIMR), Dar es Salaam, Tansania (Zertifikat-Nr. NIMR/HQ/R.8a/Vol.IX/2679) geprüft und ausdrücklich genehmigt.

- Für die Studien auf der Insel Ijinga unter dem Titel „Proof of concept study on sustainable schistosomiasis elimination through an integrated community based approach on Ijinga Island, Mwanza, Northwestern Tanzania“, lagen Ethikvoten vom NIMR Dar es Salaam (Zertifikat-Nr. MR/53/100/434), vom Lake Zone Institutional Review Board, NIMR, Mwanza, sowie der Ethikkommission der CUHAS Universität vor (Zertifikat-Nr. CREC/156/2016). Zudem wurden Genehmigungen der Regional- und Bezirksverwaltungen der Region Mwanza und des Magu Distrikts, eingeholt.

3.3 Labormethoden

3.3.1 Mikroskopische Stuhluntersuchung mittels Kato-Katz Technik

Bei der KK-Technik handelt es sich um ein qualitatives und semi-quantitatives mikroskopisches Verfahren zum Nachweis der Eier von *Schistosoma spp.*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* und Hakenwürmern in Stuhlproben. In der vorliegenden Arbeit wurde nach folgendem Standardprotokoll vorgegangen [83,177]: Zunächst wird die Stuhlprobe mit einem Spatel durch einen Sieb gedrückt, um große Partikel zu entfernen. Eine Schablone, welche ein Loch definierter Größe und Dicke enthält, wird auf einem Objektträger platziert. Das Loch wird daraufhin mit der gesiebten Probe befüllt und die Schablone anschließend wieder entfernt. Die sich nun auf dem Objektträger befindende Probe (41,7 mg) wird mit einem in Malachitgrün-Glycerin-Lösung getränkten Stück Zellophan abgedeckt. Anschließend wird ein zweiter Objektträger darüber gelegt und vorsichtig nach unten gedrückt, sodass die Stuhlprobe unter dem Zellophan gleichmäßig verteilt wird. Der obere Objektträger wird danach wieder entfernt. Dieses Stuhlquetschpräparat wird nach 24 h systematisch unter dem Mikroskop untersucht, die Anzahl der Eier im gesamten Präparat gezählt und mit 24 multipliziert, um die Anzahl der Eier pro Gramm Stuhl (EPG) zu erhalten.

Die WHO empfiehlt die KK-Technik zur Diagnose der intestinalen Schistosomiasis in Regionen mit Prävalenzen > 10-50%. Dabei sollen zwei dicke Stuhlausstriche von einer Stuhlprobe angefertigt und mikroskopiert werden. In den vorliegenden Studien wurden die beiden Ausstriche von zwei erfahrenen Labortechnikern unabhängig voneinander auf Eier von *S. mansoni* untersucht. Zur Qualitätssicherung wurden 10% der negativen und positiven Präparate von einem dritten Laboranten gegengeprüft. Zur Quantifizierung wurde der Mittelwert EPG beider KK-Ausstriche berechnet und die Intensität der *S. mansoni* Infektion nach WHO Angaben als leicht (1-99 EPG), moderat (100-399 EPG) oder schwer (> 400 EPG) kategorisiert [84].

3.3.2 Urinbasierter POC-CCA Schnelltest

Der POC-CCA-Kassettest wird zum qualitativen Nachweis einer aktiven Infektion mit *Schistosoma spp.* verwendet. Bei diesem Schnelltest wird das sogenannte zirkulierende kathodische Antigen (CCA) nachgewiesen, welches von adulten Schistosomen über Vomitus ins Blut des Wirtes abgegeben und zum Großteil über Urin ausgeschieden wird [103]. Dieses Parasitenantigen ist bei allen *Schistosoma*-Spezies nachweisbar, die Sensitivität unterscheidet sich jedoch zwischen den Arten [104]. Die höchsten CCA-Konzentrationen finden sich bei *S. mansoni*-Infektionen, weshalb der Test besonders gut für die Diagnose der intestinalen Schistosomiasis geeignet ist. Laut Hersteller können mittlere bis schwere Infektionen mit *S. haematobium* ebenfalls nachgewiesen werden. In Versuchen mit Pavianen konnte gezeigt werden, dass der Schnelltest Ergebnisse ab einer Infektion mit ca. 50 Würmern als positiv ausgibt [105]. In mehreren Studien wurde dargelegt, dass aus der Farbintensität der Testbande Rückschlüsse auf die Infektionsintensität gezogen werden können [46,107].

In der vorliegenden Arbeit wurde der POC-CCA-Test nach Herstellerangaben (Rapid Diagnostics, Pretoria, Südafrika) durchgeführt und die Testergebnisse nach einer Vier-Punkte-Skala bewertet: negativ, 1+ (einschließlich Spuren), 2+ und 3+.

3.3.3 Nachweis von *S. haematobium*

Zum Nachweis von Infektionen mit *S. haematobium* wurde ein zweistufiger Ansatz verwendet, bei dem nur Hämaturie-positive Urinproben durch anschließende Urinfiltration weiteruntersucht werden [178]. Dazu wurden zunächst alle Urinproben mithilfe eines Urinteststreifens (Roche Combur 9) auf Mikrohämaturie untersucht. Der Reagenzstreifen wurde kurz in Urin getaucht und das Testergebnis ein bis zwei Minuten später im direkten Vergleich zur mitgelieferten Farbskala abgelesen. Von den Mikrohämaturie-positiven Proben wurden 20 ml Urin durch einen Spritzenfilter mit 20 µm Maschenweite gedrückt (Millipore Art. Nr. NY2002500). Daraufhin wurden die Filter mikroskopisch auf das Vorhandensein von *S. haematobium*-Eiern untersucht [178–180]

3.3.4 Probenhandling und DNA Extraktion (Stuhlproben, Urinproben, Serum, DBS, Urinfilter)

Je nach Art der Probe mussten für den Transport nach Deutschland zunächst verschiedene Schritte zur Konservierung des Probenmaterials bzw. zur Stabilisierung der DNA (Schutz vor Degradation) durchgeführt werden. Die DNA wurde anschließend mit den für die jeweiligen Anwendungen geeigneten, kommerziell erhältlichen Kits extrahiert. Im nachfolgenden wird die Vorgehensweise für die unterschiedlichen Probenmaterialien beschrieben.

1. Stuhlproben: Die Konservierung der Stuhlproben erfolgte durch Zugabe von Ethanol 70%. Der Transport und die Lagerung fanden bei Raumtemperatur (RT) statt. Unmittelbar vor der

Extraktion der DNA musste das Ethanol wieder entfernt werden. Dazu wurde die Stuhl-Ethanol-Suspension für 1 Minute bei 9.500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Die DNA wurde anschließend mit dem QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Zur Eluierung wurden 200 µl Puffer AE verwendet.

2. Serum: Das in speziellen Serumröhrchen abgenommene Vollblut wurde für 5 Minuten bei 1.200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und erneut zentrifugiert (15 Minuten bei 3.000 g). Beide Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Der hieraus gewonnene Überstand wurde in ein 2 ml Kryoröhrchen pipettiert und bei -20°C gelagert und transportiert. Die DNA-Extraktion erfolgte aus 2 ml aufgetautem Serum (bei RT) und wurde mit dem QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) laut Herstellerangaben durchgeführt. Zur Eluierung wurden 50 µl Puffer AVE verwendet.

3. Urinproben: Um das Wachstum von Bakterien und Pilzen zu verhindern, Viren zu inaktivieren und DNA vor Degradation zu schützen, wurden die Urinproben mit einem speziellen Urinkonservierungsmittel der Firma Norgen® (Thorold, Kanada) versehen. Dazu wurde eine Einzeldosis des Reagenz (Norgen's Urine Preservative) zu je 15 ml frischem Urin gegeben, gemischt und die Proben anschließend bei Raumtemperatur gelagert. Zur Extraktion wurden jeweils 4 ml des konservierten Urins eingesetzt und ebenfalls das QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Eluierung erfolgte in 50 µl Puffer AVE.

4. *Dried blood spots*: Zur Präparation der DBSs wurden Whatman® 903 Protein Saver cards (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) verwendet. Auf jedes der vier Probenfelder wurden 125 µl EDTA-Blut aufgetragen und die Karten anschließend, geschützt vor direktem Sonnenlicht, getrocknet. Nach ca. 3 h Trocknungszeit wurden die DBSs einzeln in Zip-Beutel mit Trockenmittel verpackt und bis zur weiteren Bearbeitung bei Raumtemperatur gelagert. Zur DNA-Extraktion wurden mithilfe einer Harris Uni-Core Stanze (Qiagen, Hilden, Deutschland) acht Kreise mit einem Durchmesser von je 6 mm ausgestanzt. Je zwei dieser ausgestanzten Papiere wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl PBS überführt (insgesamt vier Reaktionsgefäße pro DBS) und für 16-18 h bei RT und 300 U/min inkubiert. Anschließend wurden die Proben 2 min bei 8.000 rpm (RT) zentrifugiert und der Überstand aller vier Reaktionsgefäße der gleichen Probe auf ein QIAamp® Mini Spin-Säulchen übertragen. Die DNA wurde daraufhin mit dem QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) laut Herstellerprotokoll isoliert und in 30 µl Puffer AE eluiert.

Alle Eluate wurden bei -20°C gelagert.

3.3.5 Real-Time PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) stellt ein automatisiertes Verfahren zur Vervielfältigung eines beliebigen DNA-Abschnitts zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre Stränge gebunden sind, dar [181]. Theoretisch ist mit dieser Technik eine exponentielle Vervielfältigung der DNA möglich. Bei der klassischen PCR erfolgt der Nachweis der amplifizierten Sequenz am Ende der Reaktion und erfordert eine nachfolgende Gelelektrophorese und Bildanalyse. Bei der Methode der Real-Time PCR entfällt diese Art der Post-PCR Analyse, da die PCR-Amplifikation und der PCR-Nachweis in einem Schritt kombiniert werden [182,183]. Zudem bietet dieses Verfahren, durch den Einsatz fluoreszierender Farbstoffe, die Möglichkeit der Quantifizierung. In der vorliegenden Arbeit wurden TaqMan-Sonden verwendet. Diese besitzen neben dem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff einen sogenannten *Quencher*, der das Fluoreszenzsignal „löscht“. Bei der Synthese des DNA-Doppelstrangs wird die gebundene Sonde, durch die zusätzliche 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase, abgebaut. Dabei entfernen sich Fluorophor und *Quencher* voneinander und ein steigendes Fluoreszenzsignal kann detektiert werden. Da die Menge der erzeugten PCR-Produkte (Amplikons) im direkten Verhältnis zum Anstieg des Fluoreszenzsignals steht, ist eine Quantifizierung hinsichtlich der DNA-Menge im eingesetzten Template möglich.

Der Prozess der Real-Time PCR wird in einem Real-Time Thermocycler durchgeführt und besteht in der Regel aus 40 Zyklen, wobei sich jeder Zyklus aus drei Schritten zusammensetzt:

1. Denaturierung: Doppelsträngige Ausgangs-DNA (dsDNA) wird durch Erhitzen auf 95°C in einzelsträngige DNA (ssDNA) „aufgeschmolzen“
2. *Annealing*: Hybridisierung der für die Zielsequenz spezifischen Primer an komplementäre Sequenzen; gewählte Temperatur basiert auf der errechneten Schmelztemperatur (T_M) der Primer (typischerweise 5°C unter der T_M der Primer)
3. Elongation: Primer-Verlängerung durch Aktivität der DNA-Polymerase bei 70-72°C. Bei sehr kurzen Amplikons kann dieser Schritt mit *Annealing*-Schritt kombiniert werden.

3.3.5.1 Zielsequenz und verwendete Primer

Die in dieser Arbeit verwendete Real-Time PCR war spezifisch für eine 121 bp *tandem repeat* Sequenz von *S. mansoni* SM1-7 (GenBank Zugangsnummer M61098), welche von Hamburger *et al.* [184] beschrieben wurde. Das verwendete Primer/Sonden-Set bestand aus einem *Forward*-Primer Sm 5'-CCG ACC AAC CGT TCT ATG A-3'; einem *Reverse*-Primer Sm 5'CAC GC TCT CGC AAA TAA TCT AAA-3' [185]; und einer Sonde Sm 5'-[FAM] TCG TTG TAT CTC CGA AAC CAC TGG ACG [(BHQ1)]-3'[122]. Das Primer/Sonden-Set wurde zur Analyse aller Probenarten (Stuhl, Blut, Urin und Schnecken) genutzt.

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland synthetisiert.

3.3.5.2 Real-Time PCR Amplifikation

Jeder Reaktionsansatz setzte sich aus 1x QuantiFast Pathogen Master Mix (QuantiFast® Pathogen PCR + IC Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland), 400 nM *Forward*- und *Reverse*-Primer, 200 nM Sonde und 2,5 µl *Template* zusammen (Gesamtvolumen 25 µl). Das Real-Time PCR Programm bestand aus folgenden Schritten: 5 min bei 95°C, gefolgt von 40 aufeinanderfolgenden Zyklen von 15 s bei 95°C und 30 s bei 60°C. Die Real-Time PCR wurde mit dem Applied Biosystems™ StepOne™ Real-Time -PCR-System durchgeführt. Das Ergebnis wurde als Schwellenwertzyklus (C_t -Wert) ausgegeben. Dieser beschreibt den Amplifikationszyklus, wo das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz überschreitet und ist umgekehrt proportional zur Menge der entsprechenden Nukleinsäuren in der Probe (je niedriger der C_t -Wert, desto größer die DNA-Ausgangsmenge in der Probe).

In jedem PCR-Lauf wurde eine *Non-Template* Kontrolle ($C_t = 0$) und eine *S. mansoni* positiv Kontrolle mitgeführt. Letztere bestand je nach zu testender Probenart aus extrahierter DNA aus einer Suspension mit 100 *S. mansoni*-Eiern oder aus DNA von im Labor mit *S. mansoni* infizierten *Biomphalaria*-Schnecken (beides wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Professor Grevelding, Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt). Zudem wurde in jedem PCR-Reaktionsgefäß eine interne Kontrolle (im QuantiFast® Pathogen PCR + IC Kit bereits enthalten) zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation und zum Ausschluss von PCR-Inhibitoren ($C_t < 33$) verwendet (Abbildung 1).

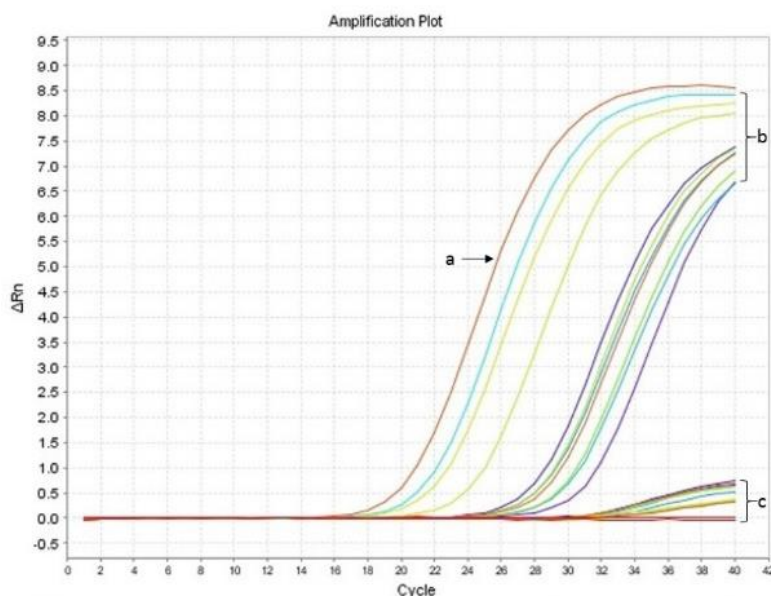


Abbildung 2: Typischer Amplifikationsplot der Real-Time PCR. R_n (Quotient aus Fluoreszenzfarbstoff der verwendeten Sonde und Referenzfarbstoff) ist gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen. Positive Kontrolle (a), Testproben (b) und interne positive Kontrollen (c) (modifiziert nach Fuss *et al.* 2019 [186]).

3.3.5 HIV Testung

Die Untersuchung der Patienten auf eine HIV-Infektion erfolgte nach den nationalen tansanischen HIV-Richtlinien, in welchen die Verwendung von Schnelltests zum qualitativen Nachweis einer Infektion empfohlen wird [187]. Gemäß den nationalen Anforderungen wurden die Studienteilnehmer sowohl vor als auch nach dem HIV-Test beraten. Nach dem nationalen Testalgorithmus wird eine HIV-Infektion auf der Grundlage von übereinstimmenden Ergebnissen von zwei oder drei seriell durchgeführten HIV-Schnelltests bestätigt. Der zweite Test sollte nur durchgeführt werden, wenn der erste Test positiv ist und der dritte Test nur, wenn die beiden ersten Tests keine übereinstimmenden Resultate aufweisen. In der hier dargestellten Studie wurden die beiden Schnelltests Determine® (Alere Determine, Chiba, Japan) und UNI-GOLD® (Trinity Biotech PLC, Bray, Irland) verwendet. Zeigten beide Tests keine Übereinstimmung, wurde ein *dried blood spot* für einen zusätzlichen ELISA-Test angefertigt. Alle Tests wurden laut Herstellerangaben durchgeführt.

3.4 Malakologische Untersuchungen

3.4.1 Schneckensammlung

Zur Sammlung der Schnecken wurden Stellen entlang der Uferlinie Ijingas gewählt, die regelmäßig von der Bevölkerung aufgesucht wurden, um den häuslichen Wasserbedarf zu decken. Zwei erfahrene lokale Forschungsassistenten führten intensive Befragungen der Inselbevölkerung durch, um die an den Sammelstellen stattfindenden Arten zur Wassernutzung zu ermitteln. Folgende Aktivitäten wurden dabei erfasst: 1. Waschen/Baden, 2. Geschirr spülen, 3. Wasser holen, 4. Schwimmen/Spielen, 5. Defäkation, 7. Wäsche waschen, 8. Zweirad waschen, 9. durchwaten, 10. Fischfang, 11. landwirtschaftliche Nutzung. Darüber hinaus wurden Beobachtungen zu Aktivitäten rund um die Wasserstellen notiert.

Die Positionen aller 16 Sammelpunkte wurden mit einem tragbaren GPS erfasst und kartiert.

Die erste Schneckensammlung fand im Februar/März 2016, vor Beginn der langen Regenzeit statt. Für die Sammlung wurden Kescher verwendet, die durch die Vegetation gestreift wurden [22]. Hängengebliebene Schnecken wurden mit Pinzetten abgesammelt und in beschriftete Behälter überführt. Die gesammelten Schnecken wurden anhand ihrer morphologischen Merkmale mit dem "Key to the identification of East and Central African freshwater snails of medical and veterinary importance" [188] bestimmt.

Die zweite Sammlung von Schnecken fand im Februar 2018 an den gleichen Stellen wie zuvor statt. Zwischen erster und zweiter Sammlung wurde nahezu die gesamte Bevölkerung Ijingas viermal mit dem Medikament PZQ behandelt.

Zu beiden Untersuchungszeitpunkten wurden die Schnecken der Gattung *Biomphalaria* in absolutem Ethanol konserviert und zur weiteren Analyse nach Würzburg transportiert.

Aufgrund der bekannten Nachteile und der Unterschätzung der Anzahl durch *Schistosoma* infizierter Schnecken, wurde der klassischerweise angewendete „*cercarial shedding test*“ in unseren Studien nicht durchgeführt [189,190].

3.4.2 DNA Extraktion

Von jeder Sammelstelle wurden maximal 50 zufällig ausgewählte Schnecken für die DNA-Extraktion verwendet. Die Schnecken wurden mit Pinzetten vorsichtig aus dem Schneckenhaus gelöst und anschließend zur Entfernung des Ethanols dreimal mit PBS gewaschen. Dazu wurden die Schnecken in 2,0 ml Reaktionsgefäße überführt, je 1 ml PBS zugegeben und 1 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das eben beschriebene wiederholt. Danach wurde jede Schnecke mit 500 µl PBS versehen und die Extraktion mit dem Qiagen QIAamp® cador® Pathogen Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt (einschließlich des Vorbehandlungsprotokolls „Rapid Partial Disruption of Tissue“). Die extrahierte DNA wurde in 150 µl Puffer AVE eluiert.

3.4.3 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR Methode wurde, wie bereits unter Punkt 3.3.5.1 „Zielsequenz und verwendete Primer“ bzw. Punkt 3.3.5.2 „Real-Time PCR Amplifikation“ beschrieben, durchgeführt.

3.4.4 Sequenzierung

Schnecken der Gattung *Biomphalaria* können sowohl als Zwischenwirt für *S. mansoni* als auch für *S. rodhaini* fungieren. Bei der Verwendung der Sequenz SM 1-7 als Zielsequenz können Kreuzreaktionen auftreten. Zur genauen Analyse wurden deshalb ca. 20% der positiv auf *S. mansoni* getesteten PCR-Amplifikationsprodukte zusätzlich einer DNA-Sequenzierung in beide Richtungen (*Forward*- und *Reversprimer*) unterzogen (Microsynth Seqlab, Göttingen, Deutschland). Die beiden Ergebnisse einer Probe wurden mit dem *Global Alignment Tool* (NCBI-BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [191–193] zusammengeführt und hinsichtlich Sequenzübereinstimmungen mit *S. mansoni* bzw. *S. rodhaini* unter Verwendung des Tools *WormBase* (<https://parasite.wormbase.org/index.html>) überprüft [194,195].

3.4.5 Wasserparameter

An allen Sammelpunkten wurden folgende Wasserwerte mit einem tragbaren Multimeter (PCE-PHD 1) (PCE Germany GmbH, Meschede, Deutschland) gemessen: Temperatur (°C), pH-Wert, Leitfähigkeit (mS), Salzgehalt (%) und gelöster Sauerstoff (mg/L). Zudem wurde die Art und Häufigkeit (geschätzt in %) der Vegetation notiert.

3.5 Statistik

3.5.1 Analyse der verschiedenen diagnostischen Tests aus humanen Probenmaterial

Die Analyse der gesammelten Daten wurde mit den Programmen Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, USA), IBM SPSS™ Statistics Version 24 (SPSS Inc., Chicago, USA) und Software R Version 3.5.0 (The R Foundation for statistical Computing, Wien, Österreich) durchgeführt. Die Ergebnisse der diagnostischen Tests wurden zur Auswertung in binäre Variablen umcodiert (1 = positiv und 0 = negativ). Die kategorischen Variablen wurden als Häufigkeiten und Prozentsätze dargestellt. Alle kontinuierlichen Variablen wurden mit einem univariaten Test analysiert und als Mittelwert oder Median mit Standardabweichung angegeben. Der arithmetische Mittelwert der *S. mansoni* Eier pro Gramm Stuhl (MWEPG) wurde aus den Eizahlen von je zwei KK-Ausstrichen berechnet. Die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen der Studienteilnehmer (Geschlecht, Alter) wurden mit dem t-Test (zwei Gruppen) oder ANOVA (mehr als zwei Gruppen) verglichen. Anhand der WHO-Klassifikation wurde die Intensität der Infektion als leicht (1-99 EPG), mittel (100-399 EPG) oder schwer (> 400 EPG) kategorisiert [84]. In einem Teil der hier vorgestellten Studien wurde zudem die Intensität der Infektion über die Farbintensität der POC-CCA-Testbande (leicht = 1+, mittel = 2+ und schwer = 3+) und dem Zyklusschwellenwert (C_t -Wert) der Real-Time PCR (leicht = $C_t \geq 30$, schwer = $C_t < 30$) bestimmt. Zur Validierung der Diagnosemethoden wurde in Abhängigkeit der jeweiligen Studie die latente Klassenanalyse (LCA) [196,197] bzw. eine Kombination der positiven Testergebnisse der serumbasierten Real-Time PCR und/oder der KK-Methode verwendet [198]. Um die Sensitivität und Spezifität mithilfe der LCA zu berechnen, wurde das poLCA-Paket für R verwendet [199,200]. Die Ergebnisse der Mikroskopie, des POC-CCA-Tests und der stuhlbasieren Real-Time PCR wurden hierbei als Indikatoren für eine zugrunde liegende latente Klasse kombiniert. Die dadurch ermittelte „wahre Krankheitsklasse“ wurde mit den tatsächlich beobachteten Testergebnissen in Beziehung gesetzt. Bei der Verwendung der kombinierten Referenz wurde für beide verknüpften Testmethoden eine Spezifität von 100% angenommen. Deshalb wurden bei diesem Modell nur die Sensitivität und der negative Vorhersagewert (NPV) berechnet. Der Kappa-Koeffizient (κ) wurde als Übereinstimmungsmaß für die verschiedenen diagnostischen Assays angewandt. Um Korrelationen zwischen C_t -Werten, EPG Stuhl und Intensitäten der POC-CCA-Testbande zu untersuchen wurden Korrelationstests nach Spearman- (r_s) bzw. Kendall-Tau (τ) durchgeführt. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde für Vergleiche der mittleren C_t -Werte genutzt. Um signifikante Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der Referenz und den anderen eingesetzten Tests zu ermitteln, wurde der McNemar-Test verwendet. Bei allen statistischen Analysen wurde ein p -Wert < 0,05 als statistisch signifikant angesehen.

3.5.2 Malakologische Datenanalyse

Die gesammelten Daten der malakologischen Studien wurden ebenfalls tabellarisch in Microsoft Excel 2013 dokumentiert und die statistischen Analysen mithilfe des Programms IBM SPSS™ durchgeführt. Die GPS-Koordinaten der Sammelstellen wurden zur Erstellung von Karten in die ExpertGPS-Software (TopoGrafix, Massachusetts, USA) übertragen. Um Korrelationen zwischen der Anzahl gesammelter Schnecken, der Anzahl infizierter Schnecken, den physikochemischen Parametern und der Vegetation zu bestimmen wurden Spearman-Korrelationen (r_s) verwendet. Zum Vergleich der Prävalenz von *S. mansoni* in der Schneckenpopulation beider Untersuchungszeitpunkte wurde der Chi²-Test (χ^2) angewandt. Der Vergleich der Wasserparameterdaten der beiden Jahre erfolgte mit dem gepaarten t-Test. Ein p -Wert < 0,05 galt als statistisch signifikant.

4. Ergebnisse

4.1 Studie zum Nachweis von *S. mansoni* DNA in Stuhlproben mittels Real-Time PCR

Ziel dieser Studie war die Methode der Real-Time PCR zum Nachweis von *S. mansoni* spezifischer DNA aus Stuhlproben hinsichtlich ihrer diagnostischen Genauigkeit mit dem klassischerweise verwendeten mikroskopischen KK-Verfahren und dem urinbasierten POC-CCA-Schnelltest zu vergleichen. Die hierfür notwendigen Proben wurden von Schulkindern zur Verfügung gestellt, die in einer für Schistosomiasis hochendemischen Region am Seeufer des Viktoriasees in Tansania leben.

Ein Großteil der hier dargestellten Ergebnisse wurden bereits in der Zeitschrift PLOS ONE in der Publikation „Comparison of sensitivity and specificity of three diagnostic tests to detect *Schistosoma mansoni* infections in school children in Mwanza region, Tanzania“ (Fuss *et al.*, 2018) publiziert [201].

4.1.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Insgesamt nahmen 305 Schulkinder aus 2 verschiedenen Grundschulen (Chabula und Kayenze) teil. Vollständige Datensets (KK, POC-CCA und Real-Time PCR-Resultate) lagen für 297 Kinder (97,4%) vor. 67% (199) der Proben stammten von Schülern der Kayenze Grundschule, 33% aus Chabula. Die Studiengruppe bestand aus 146 Mädchen (49,2%) und 151 Jungen mit einem Durchschnittsalter von 10,45 Jahren (7 bis 16 Jahre).

4.1.2 Prävalenz und Intensität der *Schistosoma mansoni* Infektion

Die durch das KK-Verfahren ermittelte Prävalenz betrug 85,2% (95% KI: 81,2-89,2), durch den POC-CCA-Schnelltest 94,9% (95% KI: 92,4-97,4). Die Real-Time PCR detektierte DNA von *S. mansoni* in 92,9% (95% KI: 90,0-95,8) der Proben (Tabelle 1). Die Urinuntersuchung mittels Urinteststreifen zeigte 12 Proben mit Hämaturie an. Diese wurden anschließend durch Urinfiltration auf eine Infektion mit *S. haematobium* weiteruntersucht. In Proben von 2 Kindern konnten Eier von *S. haematobium* nachgewiesen werden, wobei bei einem der beiden Kinder eine Doppelinfektion mit *S. mansoni* vorlag.

Tabelle 1 Prävalenz (mit 95% Konfidenzintervallen (KI)) von *S. mansoni* je nach Diagnosemethode (modifiziert nach Fuss *et al.* 2018 [201]).

Methode	N positiv/ N getestet	Prävalenz in % (95% KI)
Kato-Katz	253/297	85,2 (81,2; 89,2)
POC-CCA	282/297	94,9 (92,4; 97,4)
Real-Time PCR Stuhl	276/297	92,9 (90,0; 95,8)

Von den 253 Kindern, die ein positives KK-Resultat zeigten, konnten 91 (36%) leichte, 116 (45,8%) mittlere und 46 (18,2%) schwere *S. mansoni* Infektionsintensitäten ermittelt werden. Von den 282 POC-CCA positiven Proben, zeigten abhängig von der Farbintensität der Testkassettenbande 108 eine schwere Infektion (starke Intensität der Farbbande), 115 eine moderate und 59 eine schwache Infektionsintensität. Durch den Einsatz der Real-Time PCR konnte *S. mansoni* spezifische DNA in 276 Proben detektiert werden. Von diesen wiesen 56 eine schwache Infektionsintensität ($C_t > 30$) und 220 eine starke Infektionsintensität ($C_t < 30$) auf (Tabelle 2).

Tabelle 2 Anzahl (%) der *S. mansoni* Infektionen eingeteilt nach Infektionsintensität je nach diagnostischem Verfahren (modifiziert nach Fuss *et al.* 2018 [201]).

Methode und Intensitätskategorien	N (%)
Kato-Katz	
Negativ	44 (14,8)
Leicht (1 - 99 EPG)	91 (30,6)
Mittel (100 - 399 EPG)	116 (39,1)
Schwer (≥ 400 EPG)	46 (15,5)
POC-CCA	
Negativ	15 (5,1)
Leicht (+)	59 (19,9)
Mittel (++)	115 (38,7)
Schwer (+++)	108 (36,4)
Real-Time PCR Stuhl	
Negativ ($C_t > 38$)	21 (7,1)
Leicht ($30 > C_t \leq 38$)	56 (18,9)
Schwer ($C_t \leq 30$)	220 (74,1)

Durch alle drei verwendeten Tests konnten 81,8% (243/297) der getesteten Proben als *S. mansoni* positiv, 2,7% als negativ klassifiziert werden. Von den 44 (14,8%) mikroskopisch negativen Proben detektierte sowohl die Real-Time PCR als auch der POC-CCA-Test 29 positive Fälle. In 7 Proben, in denen Eier von *S. mansoni* nachgewiesen werden konnten, zeigte nur einer der beiden anderen Tests ebenfalls ein positives Ergebnis. In 3,4% (10) der

Proben war eine Infektion mit *S. mansoni* nur durch einen Test nachweisbar (3 Proben durch KK, 2 Proben durch Real-Time PCR, 5 Proben durch POC-CCA).

4.1.3 Sensitivität und Spezifität

Um die diagnostischen Parameter der verwendeten Tests zu bestimmen, wurden einerseits der KK-Test als Referenzmethode (trotz der bekannten Einschränkungen) und andererseits eine LCA durchgeführt (Tabelle 3).

Wenn das KK Verfahren als Goldstandard verwendet wurde, war sowohl die Sensitivität des POC-CCA-Tests (98,3%, 95% KI: 96,8-99,8%) als auch der Real-Time PCR (96,8%, 95% KI: 94,9-98,8%) hoch. Die Spezifität beider Tests war jedoch sehr gering (22,7% für den POC-CCA-Test, 29,6% für die Real-Time PCR).

Um den „wahren“ Infektionsstatus der Teilnehmer zu bestimmen, wurde eine LCA durchgeführt und die diagnostischen Parameter der verwendeten Methoden berechnet. Auch hier zeigten sich sehr hohe Werte für die Sensitivität der Real-Time PCR (98,7%) und des POC-CCA-Schnelltests (99,5%). Die Sensitivität der KK-Methode war etwas geringer (89,7%). Die mit der LCA berechneten Spezifitäten lagen deutlich über den Werten, die mit dem KK-Test als Referenz kalkuliert wurden. Die höchste Spezifität wurde von der Real-Time PCR (81,2%) erreicht, gefolgt von der KK-Methode (72,8%). Die niedrigste Spezifität wurde beim POC-CCA-Test festgestellt (63,4%).

Tabelle 3 Sensitivität und Spezifität mit 95% Konfidenzintervallen (95% KI) der einzelnen Methoden im Vergleich zu Kato Katz als Goldstandard bzw. latenter Klassenanalyse (modifiziert nach Fuss *et al.* 2018 [201]).

Methode	Sensitivität in % (95% KI)	Spezifität in % (95%KI)
Kato-Katz als Goldstandard		
Kato-Katz	N/A	N/A
POC-CCA	98,27 (96,8; 99,8)	22,73 (18,0; 27,5)
Real-Time PCR Stuhl	96,84 (94,9; 98,8)	29,55 (24,4; 34,7)
Latente Klassenanalyse		
Kato-Katz	89,7 (85,9; 93,5)	72,8 (46,3; 99,4)
POC-CCA	99,5 (98,1; 100)	63,4 (34,6; 92,1)
Real-Time PCR Stuhl	98,7 (96,5; 100)	81,2 (54,7; 100)

4.1.4 Korrelation zwischen C_T-Werten, Anzahl Eiern im Stuhl und Intensität der POC-CCA-Testbanden

Um zu überprüfen, ob es einen Zusammenhang zwischen den C_T-Werten der Real-Time PCR bzw. den via KK-Test ermittelten EPG und der POC-CCA-Testbandstärke gibt, wurden diese Daten miteinander korreliert. Zwischen der Intensität der POC-CCA-Testbande und den

C_t-Werten der Real-Time PCR wurde ein negativer Zusammenhang gefunden ($r_s = -0,28$) (Abbildung 3). Zwischen der Intensität der POC-CCA-Testbande und der Anzahl an Eiern im Stuhl konnte hingegen ein positiver Zusammenhang beobachtet werden ($r_s = 0,57$) (Abbildung 4). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es eine negative Korrelation zwischen den C_t-Werten der Real-Time PCR und der Anzahl der Eier im Stuhl ($r_s = -0,32$) gibt (Abbildung 5).

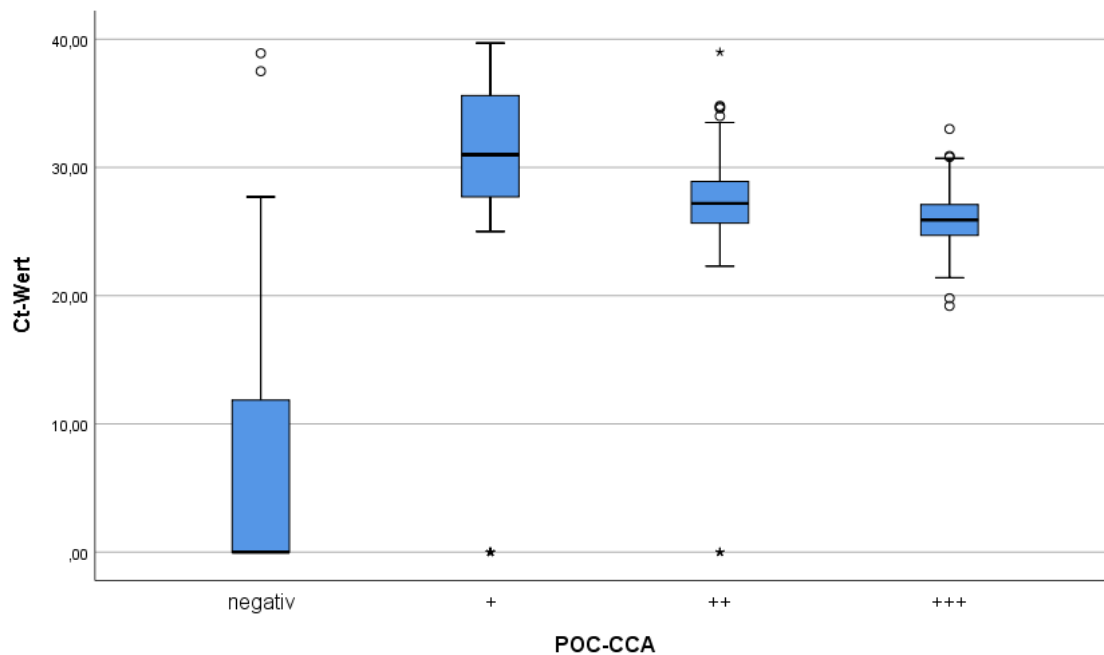


Abbildung 3: Zusammenhang zwischen der Intensität der POC-CCA Testbande und den Zyklusschwellenwerten (C_t-Werten) der Real-Time PCR. Es ist eine negative Korrelation (Spearman's Korrelationskoeffizient $r_s = -0,28$; $p < 0,001$) zwischen der Intensität der *S. mansoni* Infektion, die durch den POC-CCA-Test (Intensität der Farbbande) bestimmt wurde und den C_t-Werten der *S. mansoni* spezifischen Real-Time PCR zu sehen (modifiziert nach Fuss *et al.* 2018 [201]).

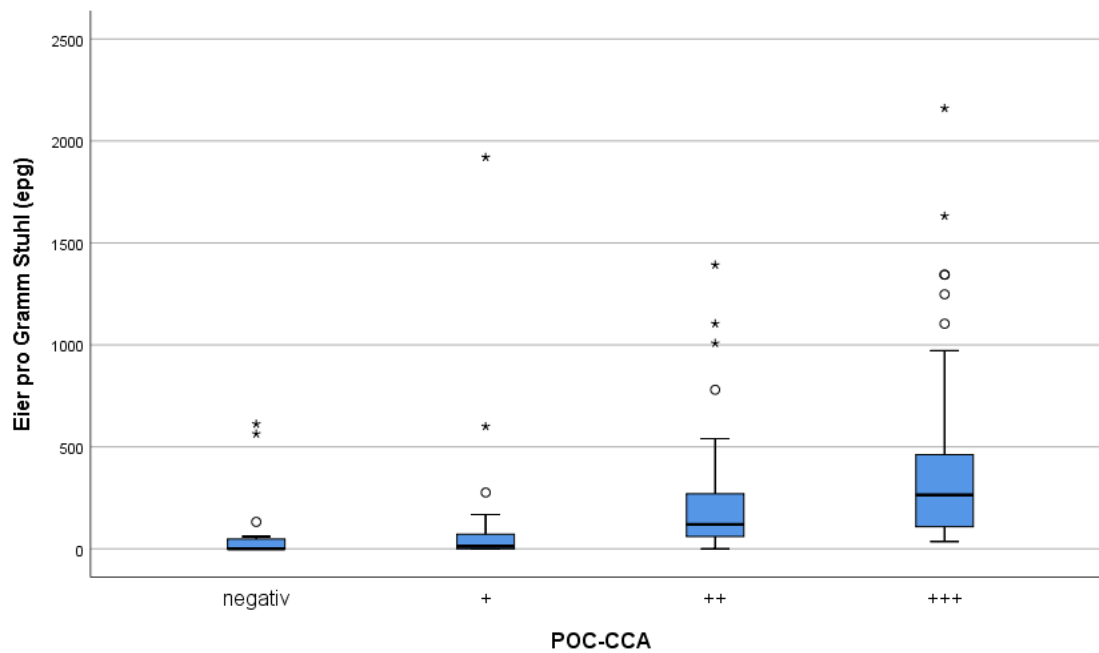


Abbildung 4: Zusammenhang zwischen der Intensität der POC-CCA-Testbande und der Anzahl Eier pro Gramm Stuhl (EPG) des KK-Tests. Die Anzahl EPG Stuhl ist positiv mit der Intensität der POC-CCA-Testbande korreliert (Spearman's Korrelationskoeffizient $r_s = 0,57$; $p < 0,001$) (modifiziert nach Fuss *et al.* 2018 [201]).

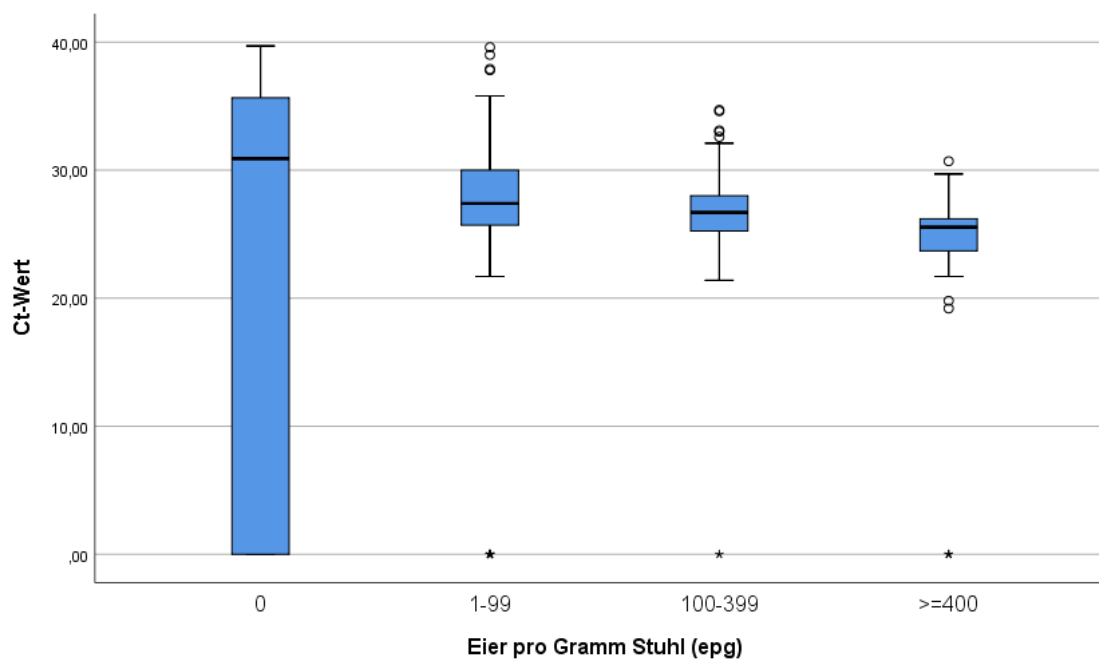


Abbildung 5: Zusammenhang zwischen den Schwellenwerten (C_t -Werten) der *S. mansoni*-spezifischen Real-Time PCR und der Anzahl Eiern pro Gramm Stuhl (EPG). Die C_t -Werte korrelieren negativ mit dem Grad der Schistosomeninfektion (bestimmt nach EPG) (Spearman's Korrelationskoeffizient $r_s = -0,32$; $p < 0,001$). *Schistosoma mansoni* Real-Time PCR positive Proben zeigen einen abnehmenden C_t -Wert mit steigender Infektionsintensität (modifiziert nach Fuss *et al.* 2018 [201]).

Um zu ermitteln, welchen Einfluss die Stärke der *S. mansoni* Infektion auf die Sensitivität des POC-CCA-Tests hat, wurden die Daten unter Berücksichtigung der verschiedenen

Intensitätsklassen analysiert. Die Einteilung in leichte, mittlere oder schwere Intensität der Infektion erfolgte aus den KK-Ergebnissen (EPG) und den C_t -Werten der Real-Time PCR. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt. Exakte Fisher-Test Berechnungen zeigten, dass die Sensitivität des POC-CCA-Tests bei Infektionen mit niedriger Intensität signifikant von der bei mittleren oder schweren Infektionsintensitäten abweicht ($p = 0,042$). Bei mittleren und schweren Infektionen betrug die Sensitivität 99,1% bzw. 98,6%. Bei leichten Infektionsintensitäten nahm die Sensitivität des POC-CCA-Tests (86,2%) ab. Von 13 Proben, welche sowohl im KK- als auch im Real-Time PCR-Test negativ waren, zeigte der POC-CCA Kassettentest bei 5 Proben eine positive Testbande (38,5%).

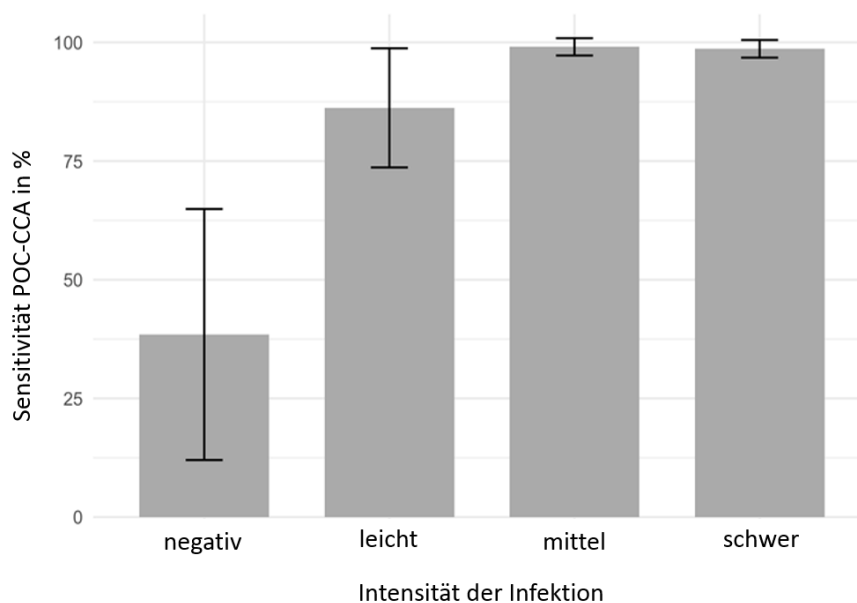


Abbildung 6: Sensitivität des POC-CCA-Urinschnelltests (mit 95% Konfidenzintervallen) bei unterschiedlichen Intensitätsklassen der *S. mansoni* Infektionen. Die Kategorisierung der Intensität der Infektionen in leicht, mittel oder schwer wurden durch die Kato-Katz (KK)-Methode (Anzahl Eier pro Gramm Stuhl (EPG)) und die Schwellenwerte (C_t -Werte) der Real-Time PCR-Ergebnisse bestimmt. Infektionen mit niedriger Intensität: KK 1 - 99 EPG oder C_t -Wert der Real-Time PCR > 30. Infektionen mit mittlerer Intensität: KK 100 - 399 EPG oder C_t -Wert < 30. Infektionen mit hoher Intensität: KK > 400 EPG und C_t -Wert der Real-Time PCR < 30. Die Spezifität des POC-CCA-Tests betrug 61,5% (modifiziert nach Fuss *et al.* 2018 [201]).

4.2 Studie zum Nachweis von *S. mansoni* DNA in Urinproben, Serum und *dried blood spot cards* mittels Real-Time PCR

Die folgenden Studien wurden durchgeführt, um zu überprüfen welches Probenmaterial und welche Art der Probenkonservierung zur Diagnose der Schistosomiasis mittels Real-Time PCR geeignet ist und ob der Nachweis *S. mansoni* spezifischer DNA zur Therapiekontrolle verwendet werden kann. Zudem wurde überprüft ob das Vorliegen einer Koinfektion mit HIV die Testperformance beeinflusst.

4.2.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Insgesamt wurden 334 Studienteilnehmer im Alter von 17-97 Jahren in die Studie einbezogen. Von diesen waren 35,9% männlich und 64,1% weiblich. Das Durchschnittsalter betrug $40,2 \pm 15,2$ Jahre. Die Altersgruppen und das Geschlecht der Studienteilnehmer sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4 Demographische Merkmale der Studienteilnehmer aus Kayenze, Nordwestliches Tansania.

Geschlecht	Altersgruppen in Jahren				Gesamt
	17-30 N (%)	31-40 N (%)	41-50 N (%)	50-97 N (%)	
Männlich	40 (40,0)	32 (32,7)	21 (32,8)	27 (37,5)	120 (35,9)
Weiblich	60 (60,0)	66 (67,3)	43 (67,2)	45 (62,5)	214 (64,1)
Gesamt	100	98	64	72	334

4.2.2 Prävalenz und Intensität der *Schistosoma mansoni* Infektion

Tabelle 5 zeigt die Prävalenz der *S. mansoni*-Infektion hinsichtlich der demographischen Merkmale der Studienteilnehmer, dem HIV-Serostatus sowie der beiden Diagnosemethoden. Basierend auf der KK-Technik betrug die Gesamtprävalenz von *S. mansoni* 42,5% (142/334, 95% KI: 37,2-48,0), verglichen mit 68,2% im POC-CCA-Test (227/333; 95% KI: 62,9-73,1). Die ermittelte Prävalenz zeigte keinen Unterschied zwischen Männer und Frauen. Ebenso wurden keine signifikanten Unterschiede in der Prävalenz von *S. mansoni*-Infektionen zwischen den verschiedenen Altersgruppen festgestellt. Der Mittelwert der Eier pro Gramm (MWEPG) Stuhl betrug 174 EPG (95% KI: 124-223). Männliche Teilnehmer hatten im Vergleich zu den weiblichen Teilnehmern einen höheren MWEPG (196 MWEPG vs. 159 MWEPG). Allerdings war dieser Unterschied ebenfalls statistisch nicht signifikant ($p = 0,468$).

Es gab eine signifikante negative Korrelation zwischen den drei verschiedenen Intensitätsgruppen der *S. mansoni* Infektionen (leichte Infektion: 1-99 EPG, mittlere Infektionsintensität: 100-399 EPG, schwere Infektion: ≥ 400 EPG) und den Altersgruppen ($r_s = -0,165$, $p < 0,01$). Innerhalb der Altersgruppe 17-30 konnten 53,1% der mittleren (17/32) und 50,0% der schweren Infektionsintensitäten (10/20) nachgewiesen werden. Die Intensität der Infektion, welche über die Bandenstärke des POC-CCA-Tests bestimmt wurden (1+, 2+, 3+) korrelierte ebenfalls negativ mit den Altersgruppen ($r_s = -0,186$, $p < 0,01$).

Bei drei Studienteilnehmern konnten Infektionen mit *S. haematobium* (Doppelinfektionen mit *S. mansoni*) nachgewiesen werden (0,9%).

Von den 41 HIV-seropositiven Studienteilnehmern konnten 43,9% (18/41) mit Hilfe der KK-Technik und 82,9% (34/41) mittels POC-CCA-Test als *S. mansoni* positiv diagnostiziert werden.

Mit der KK-Technik wurden 26,6% leichte Infektionen, 9,6% mittlere und 6,0% schwere Infektionen ermittelt. Der POC-CCA-Tests war bei 9,1% der Patienten mit leichten, 3,1% mit mittleren und 5,0% mit schweren Infektionsintensitäten negativ.

4.2.3 Prävalenz HIV-Infektion

Die Gesamtprävalenz der HIV-Infektion betrug 12,9% (41/318, 95% KI: 9,4-17,1). Weibliche Teilnehmer hatten keine signifikant höhere Prävalenz als männliche Teilnehmer (14,4% vs. 10,0%, $p = 0,263$). Die höchste Prävalenz (22,0%) konnte bei den 41-50 Jährigen nachgewiesen werden. Die Altersgruppen > 30 Jahre wiesen statistisch die höchste HIV-Seropositivität auf ($p < 0,01$).

Tabelle 5 Prävalenz der *S. mansoni*-Infektion diagnostiziert mit der Kato-Katz-Technik bzw. dem POC-CCA-Test, getrennt nach Geschlecht, Alter und HIV-Infektionsstatus.

Variablen		N	Kato-Katz Methode N (%)	p-Wert	POC-CCA Test N (%)	p-Wert
Geschlecht	Männlich	120	58 (48,3)	$p = 0,107$	81 (67,5)	$p = 0,844$
	Weiblich	214	84 (39,3)		146 (68,5)	
Altersgruppe in Jahren	17-30	100	52 (52,0)	$p = 0,063$	73 (73,0)	$p = 0,529$
	31-40	98	43 (43,3)		67 (69,1)	
	41-50	64	22 (34,4)		41 (64,1)	
	50-97	72	25 (34,7)		46 (63,9)	
HIV- Serostatus	Positiv	41	18 (43,9)	$p = 0,773$	34 (82,9)	$p < 0,05$
	Negativ	277	115 (41,5)		183 (66,3)	
Infektions- intensität <i>S. mansoni</i> (EPG)	1-99	89	89 (26,6)	N/A	80 (90,9)	$p < 0,001$
	100-399	32	32 (9,6)		31 (96,9)	
	≥ 400	20	20 (6,0)		19 (95,0)	

Eine HIV-*Schistosoma mansoni*-Koinfektion wurde durch das KK-Verfahren in 43,9% der Fälle nachgewiesen. Mittels POC-CCA-Test zeigte sich in der HIV-positiven Gruppe in 82,9% der Fälle eine *Schistosoma*-Koinfektion (Tabelle 5).

4.2.4 Verwendung der serumbasierten Real-Time PCR zum Nachweis von *S. mansoni* DNA vor und nach Behandlung mit Praziquantel

In dieser Teilstudie wurde untersucht, ob der Nachweis zirkulierender freier DNA aus Urin- bzw. Serumproben mittels Real-Time PCR für die Diagnose von Schistosomiasis geeignet ist. Die Ergebnisse wurden sowohl mit dem parasitologischen KK-Verfahren als auch mit dem POC-CCA-Test verglichen. Darüber hinaus wurde untersucht, ob mittels

serumbasierter Real-Time PCR der therapeutische Erfolg von PZQ beurteilt werden kann. Dazu wurden die durch die serumbasierte Real-Time PCR detektierten C_t -Werte, die umgekehrt proportional zur Menge der frei zirkulierenden *S. mansoni* DNA sind, während der Infektion (vor Behandlung mit PZQ) und eine (6-8 Tage) bzw. 20 Wochen (142-144 Tage) nach Gabe des Medikamentes verglichen.

Ein Großteil der unter diesem Punkt dargestellten Ergebnisse wurden in der Zeitschrift *Infectious Diseases of Poverty* unter dem Titel „Evaluation of serum-based Real-Time PCR to detect *Schistosoma mansoni* infection before and after treatment“ (Fuss *et al.* 2020) publiziert [202].

Serumproben von allen drei Untersuchungszeitpunkten lagen von 36 Probanden vor. Die Stuhlprobe eines Studienteilnehmers fehlte bei der Erhebung der Basisdaten. Das Studienkollektiv bestand aus 28 Frauen (77,8%) und 8 Männern mit einem durchschnittlichen Alter von 34,33 Jahren (18 bis 70 Jahre).

Basierend auf der KK-Technik betrug die Prävalenz von *S. mansoni* zu Studienbeginn 34,3%. Die Anzahl der Eier von *S. mansoni* variierte zwischen 12 und 1248 EPG mit einem Mittelwert von 268 (95% KI: 28-508). In 27 (75%) der Serumproben konnte DNA von *S. mansoni* mit der Real-Time PCR nachgewiesen werden. Die C_t -Werte lagen dabei zwischen 22,6 und 38 (Median 30,3). Bei Verwendung der Urinproben zur Real-Time PCR-Analyse ergab sich eine Prävalenz von 30,6%, wobei C_t -Werte zwischen 33,9 und 40 (Median 38,5) detektiert wurden. Die mit dem POC-CCA-Schnelltest ermittelte Prävalenz betrug 63,9%. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6 Prävalenz von *S. mansoni* unter Verwendung verschiedener diagnostischer Tests. Mittelwerte (mit 95% Konfidenzintervallen (KI)) und Mediane (Minimum, Maximum) der Eier pro Gramm Stuhl (EPG; KK-Methode) bzw. der C_t -Werte (Real-Time PCR) zu Studienbeginn (vor Behandlung). N = *S. mansoni* positiv/Gesamt getestet (modifiziert nach Fuss *et al.* 2020 [202]).

Methode	N	%	EPG (KK) bzw. C_t -Werte Real-Time PCR	
			Mittelwert (95% KI)	Median (Min, Max)
Kato-Katz	12/35	34,3	268 (27,9; 508,1)	120 (12; 1248)
POC-CCA	23/36	63,9	N/A	N/A
Real-Time PCR Serum	27/36	75,0	30,4 (28,8; 31,9)	30,3 (22,6; 38)
Real-Time PCR Urin	11/36	30,6	37,7 (36,3; 39,1)	38,5 (33,9; 40,7)

Zur zuverlässigen Bestimmung vorliegender *S. mansoni* Infektionen wurde eine Kombination aus den Ergebnissen des parasitologischen KK-Tests und / oder der serumbasierten

Real-Time PCR als Referenz verwendet. Dieses Vorgehen wurde bereits in anderen Studien beschrieben [198,203]. Sowohl für die KK-Methode als auch für die Real-Time PCR wurde hierbei eine Spezifität von 100% angenommen. Für die verwendeten Testmethoden wurden deshalb nur die Sensitivität und der negative Vorhersagewert (*negative predicted value* - NPV) berechnet.

Mit diesem Verfahren wurden 77,1% (27/35) *S. mansoni* positive Individuen bestimmt. Aufgrund einer fehlenden Stuhlprobe konnten nur die Ergebnisse von 35 Studienteilnehmern in die kombinierte Referenz aufgenommen werden. Die KK-Methode wies eine Sensitivität von 44,4% und einen NPV von 34,8% auf. Die Übereinstimmung zwischen den mikroskopischen Ergebnissen und dem definierten Standard war gering ($k = 0,268$, $p = 0,02$). Der POC-CCA-Test zeigte eine höhere Sensitivität (77,8%) und einen höheren NPV (53,9%) als der KK-Test und die Kappa-Statistik betrug 0,535 ($p < 0,001$). Die besten Ergebnisse wurden mit der serumbasierten Real-Time PCR erzielt (Sensitivität 96,3%; NPV 88,9%). Zudem zeigte sich eine hohe Übereinstimmung mit der Referenz ($k = 0,922$, $p < 0,001$). Von 27 *S. mansoni* positiven Proben wurde jedoch eine nicht als „positiv“ erkannt. Die Methode der urinbasierten Real-Time PCR erreichte die geringste Sensitivität (33,3%), sowie den geringsten NPV (28%). Die Übereinstimmung zwischen diesem Test und der Referenz betrug nur 0,119 ($p = 0,25$). Diese Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Aufgrund der geringen diagnostischen Performance der urinbasierten Real-Time PCR wurde diese Methode bei den weiteren Untersuchungszeitpunkten nicht mehr durchgeführt.

Tabelle 7 Sensitivität, negativer Vorhersagewert (NPV) mit 95% Konfidenzintervallen (KI) und Kappa-Statistik der verschiedenen diagnostischen Tests zu Studienbeginn. Als Referenz wurde eine Kombination aus den Ergebnissen der serumbasierten Real-Time PCR und/oder den Kato-Katz (KK)-Ergebnissen verwendet (modifiziert nach Fuss *et al.* 2020 [202]).

Methode	Sensitivität in % (95% KI)	NPV in % (95% KI)	Kappa (p)
Kato-Katz	44,4 (25,5; 64,7)	34,8 (16,4; 57,3)	0,268 ($p = 0,02$)
POC-CCA	77,8 (57,7; 91,4)	53,9 (25,1; 80,8)	0,535 ($p < 0,001$)
Real-Time PCR Serum	96,3 (81,0; 99,9)	88,9 (51,8; 99,7)	0,922 ($p < 0,001$)
Real-Time PCR Urin	33,3 (16,5; 54,0)	28,0 (12,2; 49,4)	0,119 ($p = 0,25$)

Die Behandlung mit PZQ führte zu einer signifikant reduzierten Prävalenz von *S. mansoni*. Mit der Kato-Katz-Methode konnte 20 Wochen nach Therapie keine Infektion mehr festgestellt werden (0%). Mit dem POC-CCA-Test konnte eine Prävalenz von 33,3% (12/36), mit der serumbasierte Real-Time PCR 58,3% ermittelt werden.

Die serumbasierte Real-Time PCR detektierte im Vergleich zur klassischen Stuhluntersuchung und dem POC-CCA-Schnelltest mehr *S. mansoni* infizierte Personen, sowohl vor der

Behandlung als auch 20 Wochen nach Therapie mit PZQ. Die Analyse der C_T -Werte ergab zu Studienbeginn einen Mittelwert von 30,3, sieben Tage nach Behandlung von 28 ($z = -2,395$, $p = 0,017$). Zwanzig Wochen nach der Behandlung stieg der Mittelwert signifikant auf 34,9 an ($z = -3,323$, $p = 0,001$) und war damit größer als bei der *Baseline*-Untersuchung ($z = -3,137$, $p = 0,002$). Der Verlauf der C_T -Werte zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten ist in Tabelle 8 dargestellt. Eine signifikante Korrelation zwischen den C_T -Werten der urinbasierten Real-Time PCR und den EPG Stuhl ($\tau = 0,098$, $P = 0,512$) bzw. zwischen den C_T -Werten der serumbasierten Real-Time PCR und den EPG Stuhl konnte nicht nachgewiesen werden ($\tau = -0,032$, $P = 0,812$).

Tabelle 8 Anteil der mittels serum-basierter Real-Time PCR positiv auf *S. mansoni* getesteter Proben, Mittelwerte (mit 95% Konfidenzintervallen (KI)) und Mediane (Minimum, Maximum) der C_T -Werte zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten (modifiziert nach Fuss *et al.* 2020 [202]).

Real-Time PCR Serum	vor Behandlung	1 Woche nach Behandlung	20 Wochen nach Behandlung
N Positive (%)	27 (75,0)	27 (75,0)	21 (58,3)
C_T-Mittelwert (95% KI)	30,4 (28,8; 31,9)	28,4 (27,1; 29,7)	33,9 (32,2; 35,5)
C_T-Median (Min, Max)	30,3 (22,6; 38,0)	28,0 (21,5; 35,9)	34,9 (26,6; 38,6)

4.2.5 Nachweis von *S. mansoni* spezifischer DNA mittels Real-Time PCR aus Serumproben im Vergleich zu *dried blood spot cards*

Das Ziel dieser Teilstudie war es, den Nutzen von getrocknetem Blut auf DBSs für den molekularen Nachweis von *S. mansoni* DNA zu überprüfen. Die Ergebnisse wurden dazu mit der mikroskopischen Stuhluntersuchung, dem POC-CCA-Test und den Real-Time PCR Resultaten aus gefrorenen Serumproben verglichen.

Ein Großteil der hier dargestellten Ergebnisse wurden bei der Zeitschrift PLOS ONE unter dem Titel „Real-Time PCR detection of *Schistosoma mansoni* DNA from serum samples and dried blood spot cards of an adult population in North-western Tanzania“ am 04.03.2020 zur Publikation eingereicht.

Insgesamt stellten 100 der insgesamt 334 Studienteilnehmer, zusätzlich zu den Stuhl- und Urinproben zum Nachweis der Schistosomiasis, Blutproben für die serumbasierte Real-Time PCR bzw. zur Anfertigung von DBSs zur Verfügung. Das Studienkollektiv setzte sich aus 76 Frauen und 24 Männern mit einem Durchschnittsalter von 35,6 Jahren (17 bis 70 Jahren) zusammen. Ein vollständiges Probenet (Urin, Stuhl, Serum und DBS) lag von 93 Teilnehmern vor.

Die parasitologische Untersuchung mit der KK-Methode detektierte 42,9% (42/98) *S. mansoni* positive Probanden. Die Zahl der *S. mansoni* Eier variierte zwischen 12 und 1248 EPG Stuhl. Der MWEPG lag bei 151 (95% KI: 74-229). Die mit dem POC-CCA-Schnelltest ermittelte

Prävalenz betrug 80%. Der Nachweis von *S. mansoni* spezifischer DNA mittels serumbasierter Real-Time PCR erfolgte in 84 von 95 Proben (88,4%). Die ermittelten C_t -Werte lagen dabei zwischen 22,6 und 37,4 (Median 30,1). Unter Verwendung der DBSs als Ausgangsmaterial und Analyse mit Hilfe der Real-Time PCR-Technik konnte eine Prävalenz von 41% festgestellt werden. Hierbei wurden C_t -Werte zwischen 32,5 und 39,9 gemessen (Median 37,2) (Tabelle 9). Der Vergleich der 37 Proben, bei denen sowohl mittels serumbasierter als auch DBS-basierter Real-Time PCR *S. mansoni* DNA nachgewiesen werden konnte, zeigte das die C_t -Werte der DBS-basierten Methode (Median 37,3, Minimum 32,5, Maximum 39,9) signifikant höher waren als die mit Serumproben ermittelten C_t -Werte (Median 27,5, Minimum 22,6, Maximum 33,6) ($p < 0,001$) (Abbildung 7).

Tabelle 9 Prävalenz von *S. mansoni* unter Verwendung verschiedener diagnostischer Tests. Median (Minimum, Maximum) der Eier pro Gramm Stuhl (EPG) (mit Kato-Katz-Methode (KK) ermittelt) bzw. von den Real-Time PCR detektierten C_t -Werten. N = *S. mansoni* positiv/Gesamt getestet.

Methode	N	%	EPG (KK) bzw. C_t -Werte Real-Time PCR		
			Median	Minimum	Maximum
Kato-Katz	42/98	42,9	36	12	1248
POC-CCA	80/100	80,0	N/A	N/A	N/A
Real-Time PCR Serum	84/95	88,4	30,1	22,6	37,4
Real-Time PCR DBS	41/100	41,0	37,2	32,5	39,9

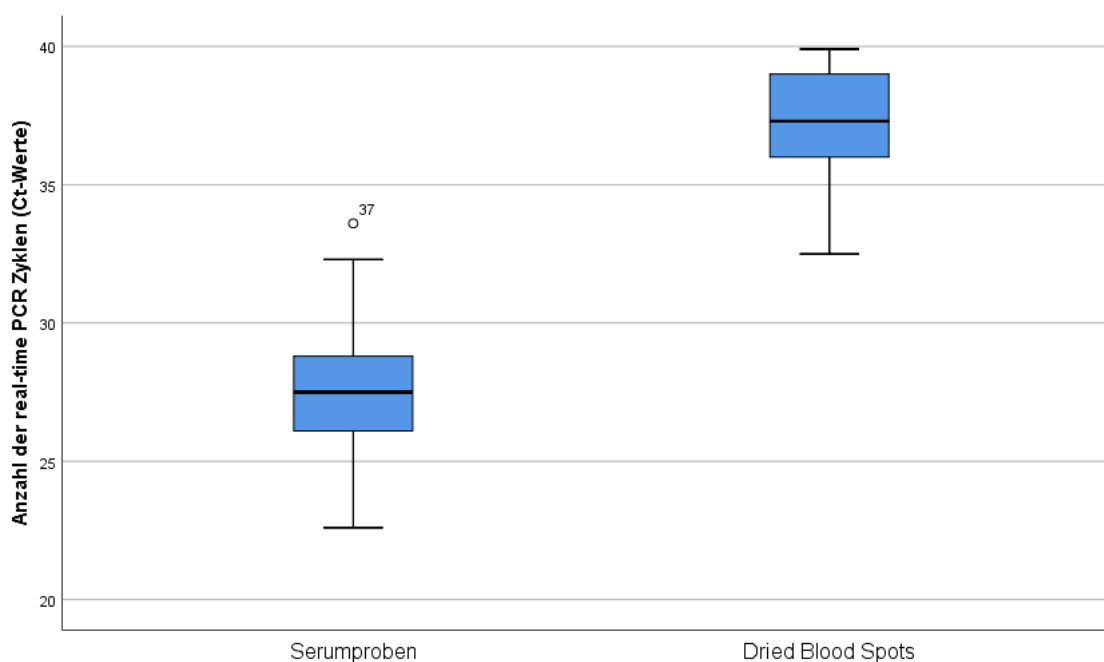


Abbildung 7: Vergleich der Real-Time PCR Zyklusschwellenwerte (C_t -Werte) der Serumproben und *dried blood spot cards* (DBSs). *Schistosoma mansoni* DNA konnte durch die Real-Time PCR-Methode in 37 Serumproben und DBSs nachgewiesen werden. Der Median C_t -Wert der Serumproben beträgt 27,5, der Median C_t -Werte der DBSs 37,3.

Auch in dieser Studie wurde eine Kombination aus den Ergebnissen des parasitologischen KK-Tests und / oder der Real-Time PCR aus Serumproben als „Goldstandard“ verwendet. Mit dieser Methodik konnten 92,5% (86/93) *S. mansoni* positive Studienteilnehmer ermittelt werden. Die serumbasierte Real-Time PCR zeigte die höchste Sensitivität (95,4%) und den höchsten NPV (63,6%) sowie eine hohe Übereinstimmung mit der Referenz ($k = 0,755$, $p < 0,001$). Vier der 86 positiven Fälle konnten mittels dieser Technik jedoch nicht diagnostiziert werden. Die geringste Sensitivität (45,4%) und der niedrigste NPV (13%) wurden mit der Methode der DBS-basierten Real-Time PCR erreicht. Die durch die Referenz ermittelte Rate von *S. mansoni* Infektionen war höher als die Positivitätsrate bestimmt durch die mikroskopische Analyse ($p < 0,001$), den POC-CCA-Test ($p = 0,002$) oder der DBS-basierten Real-Time -PCR ($p < 0,001$). Darüber hinaus zeigte sich nur eine geringe Übereinstimmung zwischen der Referenz und der KK-Methode bzw. der DBS-basierten Real-Time PCR. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10 Sensitivität, negativer Vorhersagewert (NPV) mit 95% Konfidenzintervallen (KI), McNemar und Kappa Statistik der verschiedenen verwendeten Diagnosemethoden. Als Referenz wurde eine Kombination aus den Ergebnissen der serumbasierten Real-Time PCR und den Kato-Katz (KK)-Ergebnissen verwendet.

Methoden	Sensitivität in % (95% KI)	NPV in % (95% KI)	p McNemar	Kappa (p)
Kato-Katz	48,8 (37,9; 59,9)	13,7 (5,7; 26,3)	< 0,001	0,126 (p = 0,013)
POC-CCA	84,9 (75,5; 91,7)	31,6 (12,6; 56,6)	= 0,002	0,395 (p < 0,001)
Real-Time PCR Serum	95,4 (88,5; 98,7)	63,6 (30,8; 89,1)	= 0,125	0,755 (p < 0,001)
Real-Time PCR DBS	45,4 (34,6; 56,5)	13,0 (5,4; 24,9)	< 0,001	0,111 (p = 0,019)

4.2.6 Performance der KK-Methode, des POC-CCA-Tests und der serumbasierten Real-Time PCR in Abhängigkeit vom HIV-Status

Von 35,2% (112/318) der Studienteilnehmer (86 Frauen (76,8%) und 26 Männer mit einem Durchschnittsalter von $35 \pm 10,5$ Jahren (17-70 Jahre)), die auf eine Infektion mit HIV untersucht wurden, lagen ebenfalls Serumproben zur Real-Time PCR-Analyse zur Diagnostik von *S. mansoni* vor. Daher konnte die Performance des POC-CCA-Schnelltests, des KK-Tests sowie der serumbasierten Real-Time PCR im Vergleich zur Referenz (Kombination der Ergebnisse aus KK-Test und serumbasierten Real-Time PCR) differenziert hinsichtlich des HIV-Status betrachtet werden. In Tabelle 11 sind die Sensitivität, der NPV und die Übereinstimmung (Kappa) der verschiedenen Tests mit dem definierten Standard in den untersuchten Subgruppen dargestellt. Die durch die Referenz kalkulierte Prävalenz von *S. mansoni* lag bei 86,6% (95% KI: 78,9-92,3). Die HIV-Prävalenz betrug in diesem Studienkollektiv 17% (95% KI: 10,5-25,2). Im Vergleich zur Referenz wurden innerhalb der

HIV-negativen Gruppe durch die Verwendung des KK-Tests 41 (51,25%), durch den POC-CCA-Test 15 (18,75%) und durch die serumbasierte Real-Time PCR 4 (5,0%) falsch negative Ergebnisse hinsichtlich Infektionen mit *S. mansoni* ermittelt. In der HIV-positiven Patientengruppe wurden durch die KK-Methode 9 Proben (52,9%) als falsch negativ klassifiziert. Sowohl der POC-CCA-Test als auch die Real-Time PCR detektierten alle *S. mansoni* positiven Proben zuverlässig. Die Sensitivität und der NPV waren unabhängig vom HIV-Status bei der Methode der serumbasierten Real-Time PCR am höchsten (Sensitivität 95-100%, NPV 76,5-100%). Die Übereinstimmung der Testresultate mit der kombinierten Referenz waren sehr hoch ($k = 0,842$ bzw. $1,0$). Das mikroskopische KK-Verfahren erreichte nur geringe Übereinstimmungen mit der Referenz ($k = 0,210$) im HIV-negativen und ebenfalls im HIV-positiven Kollektiv ($k = 0,158$). Die Sensitivität war im Vergleich zu den beiden anderen Untersuchungsmethoden am geringsten (47,1-48,8%). Der POC-CCA-Assay erreichte eine Sensitivität von 81,3% in der HIV-negativen und 100% in der HIV-positiven Gruppe (Tabelle 11).

Tabelle 11 Sensitivität und negativer Vorhersagewert (NPV) mit 95% Konfidenzintervallen (KI), sowie die Kappa-Statistik der verschiedenen diagnostischen Tests in Anbetracht des HIV-Status. Als Referenz wurde eine Kombination aus den Ergebnissen der serumbasierten Real-Time PCR und / oder den Kato-Katz (KK)-Ergebnissen verwendet.

Kato-Katz	Sensitivität in % (95% KI)	NPV in % (95% KI)	Kappa (p)
Gesamt	48,5 (38,2; 58,8)	23,1 (13,5; 35,2)	0,201 ($p < 0,001$)
HIV-1 negativ	48,8 (37,4; 60,2)	24,1 (13,5; 37,6)	0,210 ($p = 0,001$)
HIV-1 positiv	47,1 (23,0; 72,2)	18,2 (2,3; 51,8)	0,158 ($p = 0,202$)
POC-CCA			
Gesamt	84,5 (75,8; 91,1)	46,4 (27,5; 66,1)	0,521 ($p < 0,001$)
HIV-1 negativ	81,3 (71,0; 89,1)	42,3 (23,4; 63,1)	0,464 ($p < 0,001$)
HIV-1 positiv	100,0 (80,5; 100,0)	100,0 (15,8; 100,0)	1,0 ($p < 0,001$)
Real-Time PCR Serum			
Gesamt	95,9 (89,8; 98,9)	79,0 (54,4; 94,0)	0,862 ($p < 0,001$)
HIV-1 negativ	95,0 (87,7; 98,6)	76,5 (50,1; 93,2)	0,842 ($p < 0,001$)
HIV-1 positiv	100,0 (80,5; 100,0)	100,0 (15,8; 100,0)	1,0 ($p < 0,001$)

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei HIV-negativen Studienteilnehmern signifikant mehr Eier pro Gramm Stuhl ausgeschieden wurden (MWEPG $77,5 \pm 215,2$) als bei HIV-positiven Patienten (MWEPG $31,02 \pm 88,7$) ($p < 0,05$). Ein Unterscheid zwischen dem mittleren C_t -Wert der HIV-negativen/*S. mansoni* positiven Proben (MW $C_t = 30,14 \pm 3,4$) und HIV-positiven/*S. mansoni* positiven Proben (MW $C_t = 29,73 \pm 3,3$) konnte nicht beobachtet werden ($p = 0,652$).

4.3 Malakologische Studie auf der Insel Ijinga

Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse sind Teil des Pilotprojektes „Proof of concept study on sustainable schistosomiasis elimination through an integrated community based approach on Ijinga Island, Mwanza, Northwestern Tanzania“.

Hauptziele der Studie waren die Datenerhebung zum Vorkommen der Zwischenwirtschnecken und die Identifizierung von Transmissions-Hotspots. Zudem sollte überprüft werden ob sich Veränderungen in der Prävalenz von *S. mansoni* in der menschlichen Bevölkerung durch die Behandlung mit PZQ auch im tierischen Wirt widerspiegeln. Damit könnte die Analyse der Schnecken zur Überwachung und Bewertung der durchgeführten Maßnahmen dienen. Zunächst wurden dazu Basisdaten über die Prävalenz und Intensität der humanen *S. mansoni* Infektionen ermittelt.

Ein Großteil der folgenden Ergebnisse wurde bereits in der Zeitschrift BMC Infectious Diseases in der Publikation „Intestinal schistosomiasis of Ijinga Island, north-western Tanzania: prevalence, intensity of infection, hepatosplenic morbidities and their associated factors“ (Mueller *et al.*, 2019) publiziert [204].

4.3.1 Baseline-Screening der humanen Bevölkerung

4.3.1.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Insgesamt haben 930 Bewohner Ijingas mit einem durchschnittlichen Alter von $23,3 \pm 18,5$ Jahren in der vorliegenden Studie teilgenommen. Von diesen waren 513 (55,2%) weiblich und 418 (44,8%) männlich. Die Altersgruppen und Geschlechterverteilung der Studienteilnehmer sind in Tabelle 12 dargestellt. 87,2% der Probanden berichteten, dass sie noch nie an einer Massenbehandlung gegen Schistosomiasis teilgenommen haben. Die Mehrheit der erwachsenen Teilnehmer berichtete von Subsistenzlandwirtschaft, Viehzucht oder Fischfang zu leben.

Tabelle 12 Alters- und Geschlechterverteilung der Studienpopulation der Insel Ijinga (modifiziert nach Mueller *et al.* 2019 [204]).

Geschlecht	Altersgruppen (in Jahren)					
	1-5	6-15	16-25	26-35	36-45	≥46
Weiblich	45 (59,2%)	213 (50,9%)	65 (54,6%)	55 (53,4%)	65 (71,4%)	73 (57%)
Männlich	29 (40,8%)	205 (49,0%)	54 (45,4%)	48 (46,6%)	26 (28,6%)	55 (42,9%)
Gesamt	71	418	119	103	91	128

4.3.1.2 Mit KK-Methode ermittelte Prävalenz und Intensität der *Schistosoma mansoni* Infektion

Gesamt betrachtet betrug die Prävalenz von *S. mansoni* 68,9% (95% KI: 65,8-71,8). Bei den männlichen Teilnehmern konnte eine Prävalenz von 74,3% (95% KI: 69,9-78,3) bei den weiblichen Teilnehmern von 64,5% (95% KI: 60,3-68,6) ermittelt werden. Der Unterschied

zwischen den beiden Geschlechtern war signifikant ($\chi^2 = 10,35$, $p < 0,001$). Die höchsten Prävalenzen von *S. mansoni* konnten in den Altersgruppen 6-15 Jahre (86,1%; 95% KI: 82,4-89,1) und 16-25 Jahre (57,1%; 95% KI: 47,9-65,8) festgestellt werden und waren im Vergleich zu den anderen Altersgruppen signifikant höher ($\chi^2 = 105,61$, $p < 0,001$). In Tabelle 13 sind die Prävalenzen von *S. mansoni* hinsichtlich Geschlecht und Altersgruppen dargestellt.

Tabelle 13 Prävalenz von *S. mansoni* kategorisiert nach Alter und Geschlecht (modifiziert nach Mueller et al. 2019 [204]).

Variable		Anzahl untersucht	N	Prävalenz in % (N)	95% KI	χ^2	p-Wert
Geschlecht	Weiblich	513		64,5 (331)	60,3-68,6	10,3523	0,001
	Männlich	417		74,3 (310)	69,9-78,3		
Alter (in Jahren)	1-5	71		54,9 (39)	43,0-66,3	105,61	0,001
	6-15	418		86,1 (360)	82,5-89,1		
	16-25	119		57,1 (68)	47,9-65,8		
	26-35	103		55,3 (57)	45,4-64,7		
	36-45	91		51,7 (47)	41,3-61,8		
	≥46	128		54,7 (170)	45,8-63,2		

Der Gesamtmittelwert der Eier pro Gramm Stuhl (MWEPG) betrug 85,65 (95% KI: 77,5-94,8). Es konnte kein Unterschied zwischen den Geschlechtern festgestellt werden (Männer: 89,9 MWEPG; Frauen: 81,4 MWEPG; $t = -0,2887$, $p = 0,77$). Allerdings zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Altersgruppen 1-5 Jahre (91,9 MWEPG, 95% KI: 58,8-143,5) und 6-15 Jahre (108,6 MWEPG, 95% KI: 95,2-124,0) (F-Test = 10,71, $p < 0,0001$). Die höchsten Infektionsintensitäten wurden in der Altersgruppe 6-15 Jahre nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 und Abbildung 8 im Detail dargestellt. Bei 55,2% der Infizierten konnten leichte, bei 20,4% moderate und bei 12,9% der Studienteilnehmer schwere Infektionsintensitäten nachgewiesen werden (nach WHO-Klassifikation [84]).

Tabelle 14 Mittelwerte der Eier pro Gramm Stuhl (EPG) von *S. mansoni* unterteilt nach Alter und Geschlecht (modifiziert nach Mueller *et al.* 2019 [204]).

Variable		Mittelwert EPG	95% KI	T-Test bzw. F-Test
Geschlecht	Weiblich	89,9	78,1-103,7	t = -0,2887, p = 0,077
	Männlich	81,4	70,4-94,0	
Alter (in Jahren)	1-5	91,9	58,8-143,5	F = 10,71, p < 0,0001
	6-15	108,6	95,2-124,0	
	16-25	88,1	65,0-119,3	
	26-35	61,7	43,2-88,1	
	36-45	42,8	30,8-59,8	
	≥46	49,3	37,3-65,0	

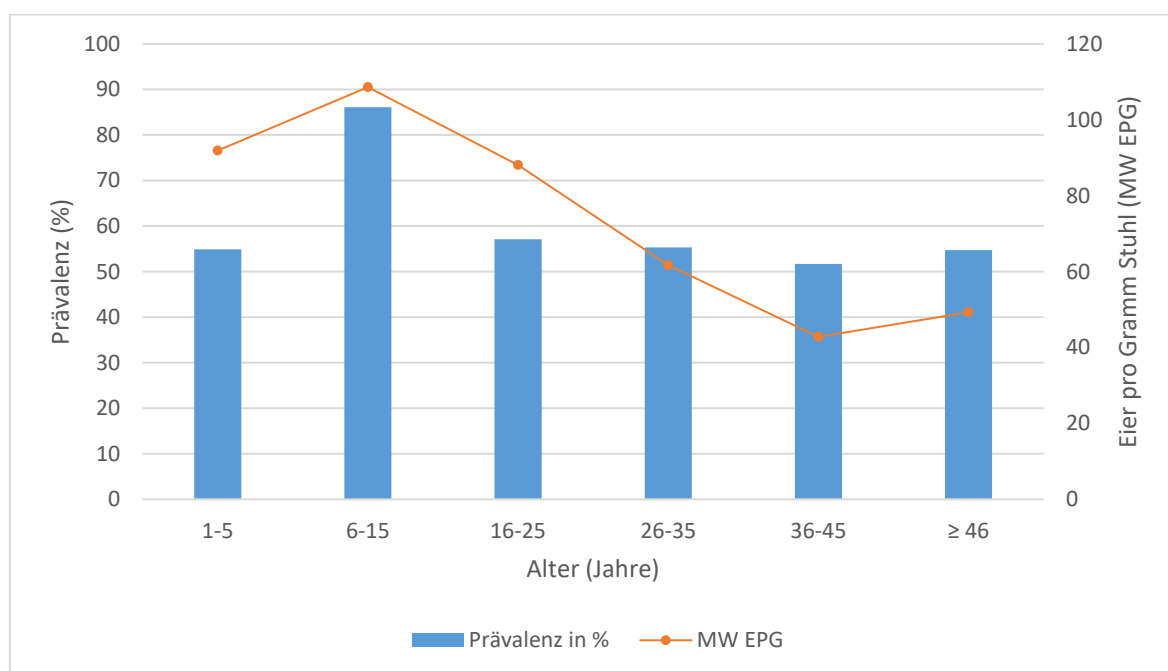


Abbildung 8: Mithilfe der Kato-Katz Methode ermittelte Prävalenz und Intensität der Infektionen (MWEPG) innerhalb der definierten Altersgruppen. Die höchsten Prävalenzen von *S. mansoni* konnten in den Altersgruppen 6-15 Jahre (86,1%) und 16-25 Jahre (57,1%) festgestellt werden und waren im Vergleich zu den anderen Altersgruppen signifikant höher ($\chi^2 = 105,61$, $p < 0,001$). Die höchsten Infektionsintensitäten wurden ebenfalls in der Altersgruppe 6-15 Jahre nachgewiesen (108,6 MWEPG).

4.3.1.3 Mit POC-CCA-Test ermittelte Prävalenz von *Schistosoma mansoni*

Urinproben für den POC-CCA-Test standen von 929 Probanden zur Verfügung. Die mithilfe des Schnelltests ermittelte Gesamtprävalenz von *Schistosoma* betrug 94,5% (95% KI: 92,8–95,8). Die Prävalenz der männlichen (96,2%) war höher als die der weiblichen Teilnehmer (93,2%) ($\chi^2 = 3,9839$, $p = 0,046$). Innerhalb der Altersgruppen konnte die höchste Prävalenz (98,1%) bei den 6-15-jährigen detektiert werden ($\chi^2 = 34,2723$, $p < 0,001$). In der

nachfolgenden Tabelle sind die mittels POC-CCA-Test ermittelten Prävalenzen von *Schistosoma*, aufgeteilt nach Alter und Geschlecht aufgeführt.

Tabelle 15 Mithilfe des POC-CCA-Test ermittelte Prävalenz von *Schistosoma* unterteilt nach Alter und Geschlecht (modifiziert nach Mueller *et al.* 2019 [204]).

Variable		Anzahl N untersucht	Prävalenz in % (N)	95% KI	X ²	p-Wert
Geschlecht	Weiblich	512	93,2 (477)	90,6-95,1	3,9839	0,046
	Männlich	417	96,2 (401)	93,8-97,6		
Alter (in Jahren)	1-5	71	95,8 (68)	87,4-98,7	34,2723	0,001
	6-15	418	98,1 (410)	96,2-99,0		
	16-25	119	91,6 (109)	84,9-95,5		
	26-35	103	88,4 (91)	80,4-93,3		
	36-45	91	97,8 (89)	91,4-99,5		
	≥46	127	87,4 (111)	80,3-92,2		

4.3.2 Baseline-Untersuchung des Zwischenwirtes

Das Hauptziel dieser Studie war die Identifizierung der Schneckenarten, die in dieser Studienregion als Zwischenwirte für *S. mansoni* fungieren und damit an der Übertragung der Infektion beteiligt sind. An ausgewählten Standorten entlang der Uferlinie, an denen die Bewohner Ijingas häufigen Wasserkontakt hatten, wurden Schnecken gesammelt. Zudem fand eine Messung der physikochemischen Parameter des Wassers statt, biotische Faktoren wurden notiert, sowie das Wasserkontaktverhalten der Inselbevölkerung erfragt. Des Weiteren wurden durch Real-Time PCR-Analysen und anschließender Sequenzierung überprüft, ob DNA von *S. mansoni* in den gesammelten Schnecken nachweisbar war und Übertragungs-Hotspots identifiziert.

Ein Großteil der hier dargestellten Ergebnisse wurden bereits in der Zeitschrift Acta Tropica in der Publikation „Malacological survey to identify transmission sites for intestinal schistosomiasis on Ijinga Island, Mwanza, north-western Tanzania“ (Fuss, 2019) publiziert [186].

4.3.2.1 Speziesbestimmung und Häufigkeit

Zur Schneckensammlung wurden 16 Stellen entlang des Seeufers rund um die Insel Ijinga aufgesucht. Insgesamt konnten 4.888, mithilfe eines Bestimmungsschlüssels anhand ihrer morphologischen Merkmale als *B. sudanica* identifizierte, Süßwasserschnecken gesammelt werden [188]. Da an den verschiedenen Sammelstellen nicht exakt die gleiche Dauer nach Schnecken gesucht wurde, wurde zum Vergleich der Daten die Anzahl der pro 15 Minuten gesammelten Schnecken berechnet. Abbildung 9 zeigt die Schneckensammelstellen auf der Insel Ijinga. An allen 16 Orten wurde *B. sudanica* nachgewiesen. Anhand der Häufigkeit der

gefundenen Süßwasserschnecken konnte folgende Einstufung erfolgen: 11 Sammelpunkte „sehr häufig“ (> 30 Schnecken), vier Standorte „mittlere Häufigkeit“ (10 - 30 Schnecken) und an einer Stelle „geringe Häufigkeit“ (< 10 Schnecken) [205].

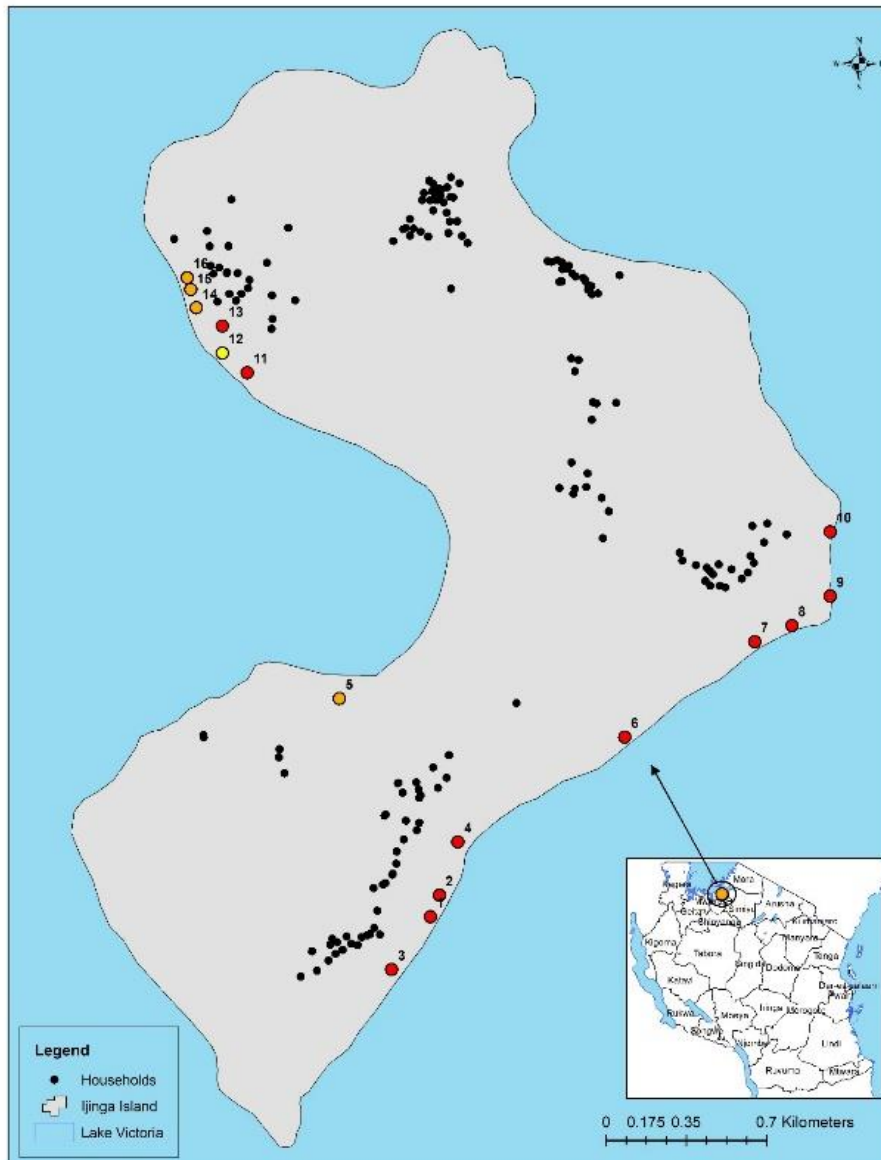


Abbildung 9: Positionen der Schneckensammlung auf der Insel Ijunga. Die Farben der Punkte repräsentieren die Häufigkeit der gefundenen *Biomphalaria* an der jeweiligen Stelle: hoch (> 30 Schnecken/15 min = rot), mittel (10 - 30 Schnecken/15 min = orange) und niedrig (< 10 Schnecken/15 min = gelb) [205]. Die Karte wurde mit der ExpertGPS-Software (TopoGrafix, Massachusetts, USA) erstellt (modifiziert nach Fuss *et al.* 2019 [186]).

4.3.2.2 Nachweis *Schistosoma*-spezifischer DNA mittels Real-Time PCR im Zwischenwirt

Insgesamt wurden 788 Schnecken mittels Real-Time PCR analysiert. In 35,4% (279/788) der Schnecken konnte DNA von *S. mansoni* nachgewiesen werden. 14 Sammelpunkte wiesen positiv getestete Schnecken auf. An drei Sammelpunkten (Nr. 3, 5 und 12) konnte in über 90% der getesteten Schnecken *S. mansoni* DNA detektiert werden. An vier Orten lag die Prävalenz infizierter Schnecken unter 20% (Nr. 4, 8, 11 und 15). Nur an zwei Sammelpunkten (10 und

16) konnten keine infizierten Schnecken nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 16 und Abbildung 10 dargestellt.

Es ist bekannt, dass *Biomphalaria*-Arten als Zwischenwirte für *S. mansoni* als auch für die Schwesternart *S. rodhaini* fungieren können. Da bei Verwendung von SM 1-7 als Zielsequenz Kreuzreaktionen auftreten können, wurden 19,7% (55/279) der positiv auf *S. mansoni* getesteten PCR-Amplikons zusätzlich sequenziert. Alle Sequenzen zeigten die höchste Übereinstimmung mit *S. mansoni* (BioProject PRJEA36577 [206,207]). Die e-Werte lagen zwischen $4,0e^{-14}$ und $3,4e^{-112}$.

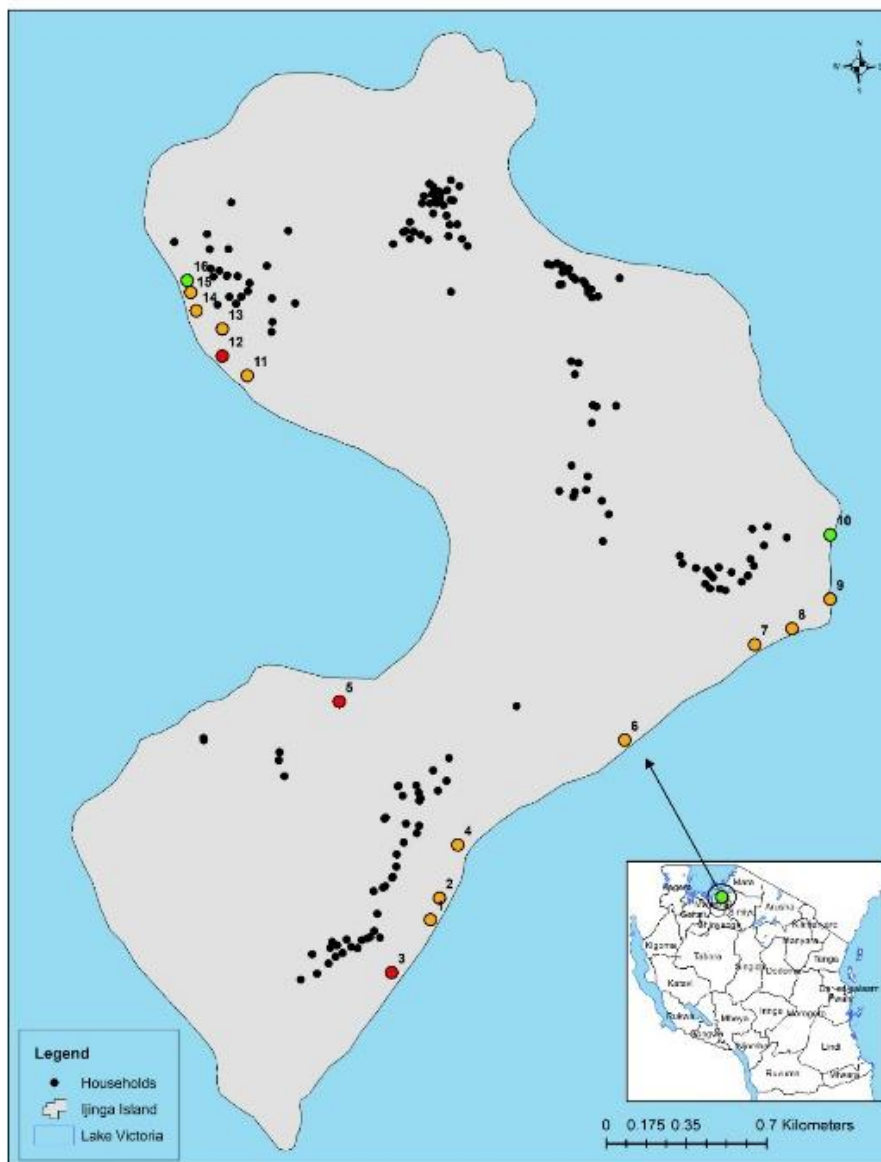


Abbildung 10: Anzahl der mit *S. mansoni* infizierten Schnecken an den jeweiligen Sammelstellen auf der Insel Ijunga. Die Farben der Punkte stellen den Prozentsatz der *Biomphalaria* dar, die mit *S. mansoni* infiziert waren. Grün: Prävalenz = 0%; Orange: Prävalenz > 0% und < 90%; Rot: Prävalenz > 90%. Die Karte wurde mit der ExpertGPS-Software (TopoGrafix, Massachusetts, USA) erstellt (modifiziert nach Fuss *et al.* 2019 [186]).

Tabelle 16 Anzahl der *Biomphalaria*-Schnecken, die an der jeweiligen Sammelstelle gesammelt und mittels Real-Time PCR untersucht wurden, sowie die Anzahl (%) der mit *S. mansoni* infizierter Schnecken (modifiziert nach Fuss *et al.* 2019 [186]).

Sammelstelle	Anzahl <i>Biomphalaria</i> gesammelt	Anzahl <i>Biomphalaria</i> 15 min	Anzahl getesteter <i>Biomphalaria</i>	Anzahl (%) mit <i>Schistosoma</i> infizierter <i>Biomphalaria</i>
1	340	114	50	15 (30)
2	126	45	50	15 (30)
3	571	430	50	46 (92)
4	509	191	50	9 (18)
5	96	25	50	47 (94)
6	441	146	50	16 (32)
7	568	291	50	17 (34)
8	705	216	50	2 (4)
9	702	200	50	11 (22)
10	127	48	50	0 (0)
11	196	40	50	9 (18)
12	42	6	38	37 (97,4)
13	175	38	50	10 (20)
14	82	16	50	38 (76)
15	100	19	50	7 (14)
16	108	27	50	0 (0)
Gesamt	4888	1852	788	279 (35,4)

4.3.2.3 Analyse der physikochemischen Wasserparameter und biotischen Faktoren

Als Vegetation konnten an allen Sammelstellen Gräser, aquatische Makrophyten, Wasserhyazinthen und Binsen (*Juncus*-Arten) in unterschiedlich starker Ausprägung verzeichnet werden. *Biomphalaria sudanica* konnte zwar bei allen Vegetationsarten gefunden werden, war jedoch am stärksten mit Gras assoziiert ($r_s = 0,621$, $p = 0,010$, $n = 16$). Die mittlere Wassertemperatur betrug $28,5^\circ\text{C} \pm 1,6^\circ\text{C}$ ($26,1^\circ\text{C}$ - $31,5^\circ\text{C}$). Der pH-Wert variierte stark zwischen den unterschiedlichen Sammelorten mit einem mittleren pH-Wert von $7,16 \pm 0,77$ ($6,61$ - $9,78$). Die Leitfähigkeit betrug im Mittel $0,41 \text{ mS} \pm 0,19$ ($0,107$ - $0,634 \text{ mS}$). Der Salzgehalt lag im Mittel bei $0,021\% \pm 0,0089$ ($0,01$ - $0,03\%$) und der Mittelwert an gelöstem Sauerstoff betrug $6,97 \text{ mg/l} \pm 2,83$ ($1,4$ - $13,1 \text{ mg/l}$). Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Wassertemperatur ($p = 0,8$), pH-Wert ($p = 0,6$), Leitfähigkeit ($p = 0,9$), gelöstem Sauerstoff ($p = 0,8$) und der Häufigkeit gefundener Schnecken festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der infizierten *Biomphalaria*-Schnecken und dem Salzgehalt ($r_s = 0,504$, $p = 0,047$, $n = 16$) gezeigt werden.

Tabelle 17 veranschaulicht die physikochemischen Wasserwerte an den verschiedenen Sammelstellen.

Tabelle 17 Physikochemische Wasserwerte der verschiedenen Sammelstellen, sowie Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) (modifiziert nach Fuss *et al.* 2019 [186]).

Sammel- stelle	Temperatur in °C	pH-Wert	Salzgehalt in %	Leitfähigkeit in mS	gelöster Sauerstoff in mg/L
1	26,8	6,74	0,01	0,107	6,8
2	30,4	7,08	0,01	0,153	1,6
3	30,0	6,91	0,02	0,416	4,9
4	31,5	9,78	0,01	0,224	4,5
5	29,4	7,1	0,01	0,275	13,1
6	30,0	6,89	0,01	0,175	1,4
7	27,0	6,61	0,03	0,575	8,5
8	27,1	7,01	0,03	0,581	8,5
9	27,5	6,84	0,03	0,613	8,7
10	27,2	6,84	0,03	0,634	8,1
11	30,6	7,5	0,02	0,325	8,0
12	26,1	6,88	0,02	0,483	6,8
13	28,1	7,05	0,03	0,556	7,1
14	28,3	7,85	0,02	0,304	8,0
15	27,6	6,77	0,03	0,633	7,7
16	28,1	6,68	0,03	0,572	7,8
Mittel- wert ± SD	28,5 (± 1,6)	7,16 (± 0,77)	0,021 (± 0,009)	0,41 (± 0,19)	6,97 (± 2,83)

4.3.2.4 Wassernutzung an den Sammelstellen

Zwei erfahrene lokale Forschungsassistenten führten intensive Befragungen der Inselbevölkerung durch, um die Wassernutzung an den verschiedenen Sammelstellen zu ermitteln. Darüber hinaus wurden Beobachtungen zu Aktivitäten rund um die Wasserstellen notiert. An Sammelstelle Nr. 1 (die auch die Bootsanlegestelle für die regelmäßige Fährverbindung ist) wurde nur eine Tätigkeit genannt (Geschirrspülen). Alle anderen Wasserstellen wurden zur Körperpflege, zum Wäschewaschen und Geschirrspülen, zum Wasserholen, zum Schwimmen/Spielen und zum Fischfang genutzt. Obwohl an allen Sammelstellen die Defäkation verneint wurde, konnten an einigen Orten menschliche Fäkalien gesichtet werden. Zum Zeitpunkt der Studie war das Seewasser die einzige Wasserquelle, weshalb ein intensiver Seewasserkontakt zwingend notwendig war.

4.3.3 Untersuchungen der Sentinelgruppe

Durch den häufigen Kontakt mit zerkarienhaltigem Wasser sind Kinder und junge Erwachsene am stärksten von der Schistosomiasis betroffen. Sowohl die Prävalenz als auch die Intensität der Infektionen erreichen ihren Höhepunkt zwischen dem 10.-15. Lebensjahr und nehmen mit zunehmendem Alter wieder ab [31,208]. Um den Erfolg des auf Ijinga angewendeten intensivierten Behandlungsschemas zu überprüfen, wurde ein Teil der dort lebenden Schulkinder als „Sentinelgruppe“ zur regelmäßigen Kontrolle des Behandlungserfolges

ausgewählt. Die Untersuchungen erfolgten mittels KK-Technik und POC-CCA-Test und wurden jeweils sechs Wochen nach der Behandlung mit PZQ durchgeführt. Die ersten drei Behandlungen erfolgten im monatlichen Abstand, die vierte Behandlungsrunde fand ein viertel Jahr später statt. Da zwischen den letzten beiden Therapien eine Behandlungspause von drei Monaten lag und hier hohe Reinfektionsraten zu erwarten waren, wurden die Probanden zudem kurz vor der vierten Behandlung untersucht.

4.3.3.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Die Sentinelgruppe bestand aus 223 Kindern im Alter zwischen 8 und 15 Jahren ($11,2 \pm 1,7$). Davon waren 118 Mädchen (52,9%) und 105 Jungen (47,1%).

4.3.3.2 Mit Kato-Katz ermittelte Prävalenz und Intensität der *S. mansoni* Infektion

Trotz der ersten Gabe von PZQ konnte bei der parasitologischen Überprüfung eine Gesamtprävalenz von 33,6% (95% KI: 27,5-40,2) festgestellt werden. Bei den Mädchen wurde eine Prävalenz von 29,7% (95% KI: 21,6-38,8) bei den Jungen von 38,1% (95% KI: 28,8-48,1) detektiert. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($\chi^2 = 1,77$, $p = 0,183$).

Nach der zweiten Behandlungsrunde sank die Prävalenz der Sentinelgruppe auf 12,6% (95% KI: 8,5-17,6). Bei den Mädchen konnte eine Prävalenz von 10,2% (95% KI: 5,4-17,1) bei den Jungen von 15,2% (95% KI: 9,0-23,6) ermittelt werden. Dieser Unterschied war ebenfalls nicht signifikant ($\chi^2 = 1,3$, $p = 0,254$).

Nach der dritten medikamentösen Therapie betrug die Gesamtprävalenz 3,6% (95% KI: 1,6-6,9). Bei den Mädchen konnte eine Prävalenz von 2,5% (95% KI: 0,5-7,3) bei den Jungen von 4,8% (95% KI: 1,6-10,8) detektiert werden. Auch dieser Unterschied war nicht signifikant ($\chi^2 = 0,791$, $p = 0,374$).

Zwischen der dritten und vierten Behandlung lag ein viertel Jahr Behandlungspause. In dieser Zeit stieg die Prävalenz von *S. mansoni* wieder auf 19,3% (95% KI: 14,3-25,1) an. Es konnte zudem ein signifikanter Unterschied zwischen der Prävalenz von *S. mansoni* bei den weiblichen Teilnehmern (13,6%; 95% KI: 8,0-21,1) und männlichen Teilnehmern (25,7%; 95% KI: 17,7-35,2) festgestellt werden ($\chi^2 = 5,274$, $p = 0,022$).

Sechs Wochen nach der vierten Behandlung mit PZQ war erneut ein starker Anstieg der Prävalenz zu verzeichnen. Die Gesamtprävalenz lag bei 28,7% (95% KI: 22,9-35,1). Die Prävalenz bei den Mädchen betrug 30,5% (95% KI: 22,4-39,7) bei den Jungen 26,7% (95% KI: 18,5-36,2). Die Mädchen zeigten hier eine höhere Prävalenz von *S. mansoni* als die männlichen Probanden, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($\chi^2 = 0,401$, $p = 0,527$). In

Tabelle 18 und Abbildung 11 sind die mittels KK ermittelten Prävalenzen dargestellt.

Tabelle 18 Prävalenz von *S. mansoni* kategorisiert nach Geschlecht und Kontrolluntersuchung (KU).

Geschlecht	Prävalenz in % (95% KI)				
	1. KU	2. KU	3. KU	4. KU	5. KU
Weiblich	29,7 (21,6-38,8)	10,2 (5,4-17,1)	2,5 (0,5-7,3)	13,6 (8,0-21,1)	30,5 (22,4-39,7)
Männlich	38,1 (28,8-48,1)	15,2 (9,0-23,6)	4,8 (1,6-10,8)	25,7 (17,7-35,2)	26,7 (18,5-36,2)
Gesamt	33,6 (27,5-40,2)	12,6 (8,5-17,6)	3,6 (1,6-6,9)	19,3 (14,3-25,1)	28,7 (22,9-35,1)
χ^2, p-Wert	1,77, $p = 0,183$	1,3, $p = 0,254$	0,791, $p = 0,374$	5,274, $p = 0,022$	0,401, $p = 0,527$

Der Gesamtmittelwert der EPG Stuhl betrug nach der ersten Behandlung 56,07 EPG (95% KI: 32,88-78,27), nach der zweiten Therapie 80,29 EPG (95% KI: 43,99-116,58) und nach der dritten PZQ Gabe 4,19 EPG (95% KI: 0,9-7,49). Vor der vierten Behandlung wurden im Mittel 9,09 EPG (95% KI: 6,07-12,12) detektiert und nach der vierten Behandlung 23,79 EPG (95% KI: 14,93-32,64). Zwischen den Geschlechtern konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die mittlere Eiausscheidung der gesamten Sentinelgruppe sowie getrennt nach Geschlecht ist für alle Kontrolluntersuchungen in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19 Mittelwerte der Eier pro Gramm Stuhl (EPG) von *S. mansoni* je Kontrolluntersuchung (KU) unterteilt nach Geschlecht.

Geschlecht	Mittelwert EPG (95% KI)				
	1. KU	2. KU	3. KU	4. KU	5. KU
Weiblich	47,8 (19,8-75,8)	47,0 (15,7-78,3)	3,5 (-1,1-8,0)	7,8 (3,4-12,2)	21,9 (9,0-34,8)
Männlich	65,4 (27,0-103,7)	117,7 (49,1-186,3)	5,0 (0,2-9,9)	10,5 (6,3-14,7)	25,9 (13,8-38,1)
Gesamt	56,07 (32,88-79,27)	80,29 (43,99-116,6)	4,197 (0,9-7,49)	9,09 (6,07-12,12)	23,79 (14,93-32,64)

4.3.3.3 Mit POC-CCA-Test ermittelte Prävalenz von *S. mansoni*

Die mithilfe des Schnelltests ermittelte Gesamtprävalenz von *Schistosoma* betrug nach der ersten Behandlungsrunde 53,4% (95% KI: 46,6–60,1). Nach der zweiten Behandlung sank diese auf 10,8% (95% KI: 7,0–15,6) und stieg nach der dritten Behandlung wieder leicht auf 12,6% (95% KI: 8,5–17,6) an. In der Behandlungspause konnte ein Prävalenz von 32,7% (95% KI: 26,6–39,3) ermittelt werden. Nach der vierten PZQ Gabe stieg die Prävalenz auf den gleichen Wert wie nach der ersten therapeutischen Intervention an (53,4%; 95% KI: 46,6–60,1) (siehe Abbildung 11). Hinsichtlich des Geschlechts gab es in keiner Kontrolluntersuchung statistisch signifikante Unterschiede in der Prävalenz von *S. mansoni*.

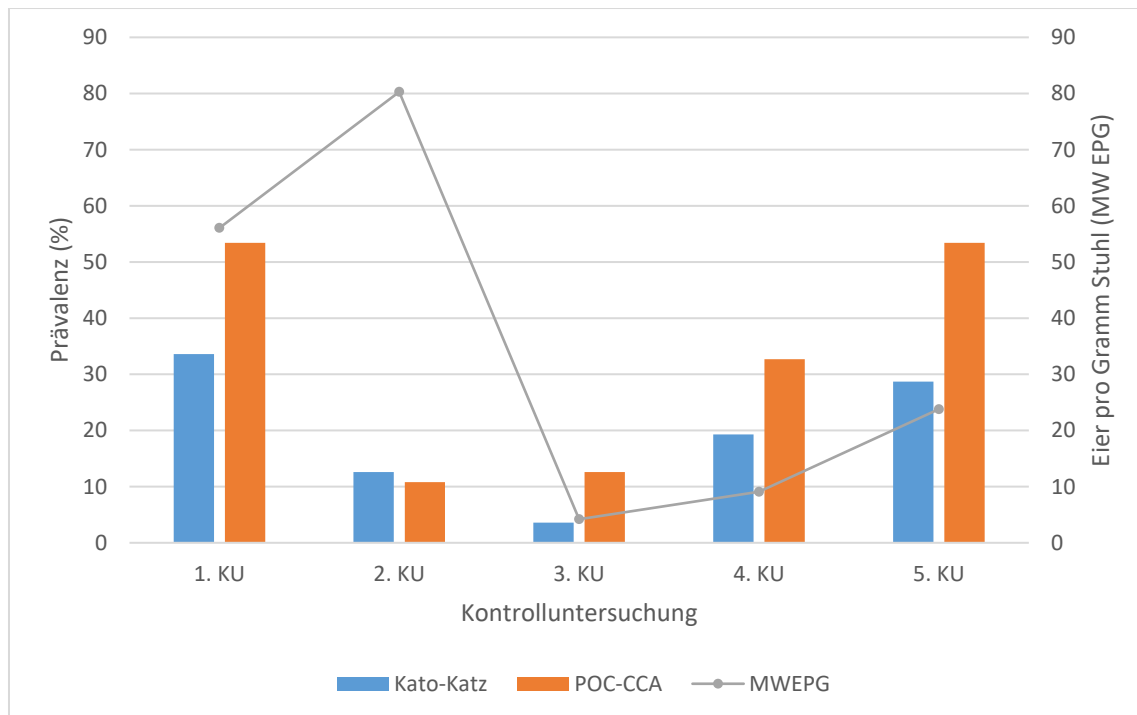


Abbildung 11: Prävalenz (mit Kato-Katz (KK) und POC-CCA-Test ermittelt) und Intensität der Infektion (MWEPEG) bei den einzelnen Kontrolluntersuchungen (KU). Die nach der ersten Gabe von Praziquantel (PZQ) mit Hilfe der KK-Technik detektierte Prävalenz von 33,6% erreichte den niedrigsten Wert nach der dritten Behandlung (3,6%). Während der nachfolgenden Untersuchungen (4. und 5. KU) konnte jedoch wieder ein Anstieg bis auf 28,7% verzeichnet werden. Die mit dem POC-CCA-Test ermittelte Prävalenz stieg nach fünf Behandlungsrunden wieder auf den Ausgangswert (53,4%) an. Der Gesamtmittelwert der EPG Stuhl betrug nach der ersten Behandlung 56,07 EPG, nach der zweiten 80,29 EPG. Nach drei Therapierunden sank die mittlere Zahl EPG Stuhl auf 4,19. Vor der vierten Behandlung wurden im Mittel 9,09 EPG detektiert und bei der fünften KU 23,79 EPG.

4.3.4 Malakologische Analyse nach 4 Behandlungsrunden der humanen Bevölkerung

Ziel dieser Studie war es zu überprüfen, ob sich Veränderungen in der Prävalenz von *S. mansoni* in der menschlichen Bevölkerung durch die Behandlung mit PZQ auch im Zwischenwirt widerspiegeln. Da die adulten Schistosomen durch die Behandlung abgetötet und somit weniger Eier ausgeschieden werden, sollte auch die Kontamination der Umwelt mit Parasiteneiern und die nachfolgende Übertragung des Parasiten auf die Süßwasserschnecken reduziert sein. Somit könnte der Erfolg von Behandlungsprogrammen über Untersuchungen des Zwischenwirtes sichtbar gemacht werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Prävalenz der *S. mansoni*-Infektion im intermediären Schneckenwirt vor und nach vier Behandlungsrunden der nahezu gesamten Bevölkerung Ijingas verglichen.

4.3.4.1 Speziesbestimmung und Häufigkeit

Im Jahr 2016 wurden insgesamt 1.852 *B. sudanica* Schnecken an den 16 aufgesuchten Stellen gesammelt (15 min Sammlungsdauer pro Sammelstelle). Im Jahr 2018 wurden dieselben Punkte erneut aufgesucht und es wurden insgesamt 640 *B. sudanica* an 12 Sammelplätzen gesammelt. An vier Orten wurden keine Schnecken gefunden. In Tabelle 20 ist die Anzahl der

gesammelten Schnecken von beiden Sammlungszeitpunkten dargestellt. Zudem konnten 8 Schnecken verschiedener Gattungen gesammelt werden, die keine Zwischenwirte für *S. mansoni* sind (4 Schnecken der Gattung *Limnaea* (Zwischenwirt für *Fasciola hepatica*), 2 Schnecken der Gattung *Melanoides* und 2 Schnecken der Gattung *Pila*).

Tabelle 20 Anzahl der gesammelten *Biomphalaria* in 2016 bzw. 2018 je Sammelstelle.

Sammel- stelle	2016	2018
	Anzahl <i>Biomphalaria</i>	
1	114	2
2	45	187
3	430	16
4	191	53
5	25	57
6	146	35
7	291	172
8	216	16
9	200	0
10	48	1
11	40	33
12	6	62
13	38	6
14	16	0
15	19	0
16	27	0
Gesamt	1852	640

4.3.4.2 Nachweis *Schistosoma*-spezifischer DNA mittels Real-Time PCR im Zwischenwirt

Zur Analyse standen 2018 nur von neun Sammelstellen ausreichend viele *Biomphalaria* zur Verfügung (Nr. 2-8, 11 und 12). Um die molekularbiologischen Daten beider Untersuchungszeitpunkte vergleichen zu können, werden deshalb im Folgenden nur die Sammelstellen berücksichtigt, von denen Ergebnisse aus beiden Jahren vorliegen.

Von diesen neun Sammelpunkten wurden im Jahr 2016 insgesamt 438 *Biomphalaria* zur Real-Time PCR-Analyse verwendet. In 46,6% (198/438) (95% KI: 18,1 - 75,1) der untersuchten Schnecken konnte DNA der *S. mansoni*-Gruppe (*S. mansoni* bzw. *S. rodhaini*) nachgewiesen werden. An allen neun Sammelpunkten konnten infizierte Schnecken detektiert werden. Sequenzanalysen deuteten darauf hin, dass es sich hierbei um Infektionen mit *S. mansoni* handelte (siehe Punkt 4.3.2.2 „Nachweis *Schistosoma*-spezifischer DNA mittels Real-Time PCR im Zwischenwirt“).

2018 wurden insgesamt 350 *Biomphalaria* mittels Real-Time PCR untersucht und es konnte eine Prävalenz von 16,8% (57/350) (95% KI: 3,4 - 30,3) ermittelt werden. Auch hier wiesen alle neun Sammelstellen mit *Schistosoma* infizierte Schnecken auf. Neunzehn der 57 (33,4%)

positiven Real-Time PCR-Amplikons wurden zur weiteren Analyse sequenziert. Alle Sequenzen zeigten die höchste Übereinstimmung mit *S. mansoni* (BioProject PRJEA36577 [206,207]). Die e-Werte lagen zwischen $6,7e^{-12}$ und $1,9e^{-55}$.

Der Vergleich der Prävalenzdaten beider Untersuchungszeitpunkte zeigte einen signifikanten Unterschied. Bei der *Baseline*-Untersuchung wurde die höchste Zahl infizierter Schnecken verzeichnet. Bei der zweiten Analyse, also nach vier Behandlungsrunden der Inselbewohner, wurden deutlich niedrigere Prävalenzen in der Schneckenpopulation festgestellt ($\chi^2(1) = 74.335$, $p < 0.001$, $\phi = 0.307$). Betrachtet man nur die Sammelstellen mit der in 2016 höchsten ermittelten Prävalenz (Nr. 3, 5 und 12) konnte ein Rückgang von 94,5% auf 7,4% im Jahr 2018 festgestellt werden. Allerdings wiesen drei Orte (Nr. 2, 8 und 11) 2018 mehr infizierte Schnecken als in der vorherigen Analyse auf (siehe Tabelle 21).

Bei der Real-Time PCR-Untersuchung der Schnecken der Gattungen *Limnaea*, *Melanoides* und *Pila* konnte keine DNA von *S. mansoni* nachgewiesen werden.

Tabelle 21 Prävalenz von *S. mansoni* im Zwischenwirt *Biomphalaria* im Vergleich zum Zeitpunkt vor Behandlung (2016) und nach viermaliger Behandlung der Inselbevölkerung (2018).

Sammelstelle	2016		2018		χ^2	p-Wert
	Anzahl getesteter <i>Biomphalaria</i>	Anzahl (%) mit <i>Schistosoma</i> infizierter <i>Biomphalaria</i> n (%)	Anzahl getesteter <i>Biomphalaria</i>	Anzahl (%) mit <i>Schistosoma</i> infizierter <i>Biomphalaria</i> n (%)		
2	50	15 (30)	50	24 (48)	74,335	< 0.001
3	50	46 (92)	16	1 (6,25)		
4	50	9 (18)	50	2 (4)		
5	50	47 (94)	50	6 (12)		
6	50	16 (32)	35	2 (5.7)		
7	50	17 (34)	50	2 (4)		
8	50	2 (4)	16	4 (25)		
11	50	9 (18)	33	14 (42,4)		
12	38	37 (97,4)	50	2 (4)		
Gesamt	438	198 (46,6)	350 (35,4)	57 (16,8)		

4.3.4.3 Analyse der physikochemischen Wasserwerte

Die Erfassung der Wasserparameter 2016 wurde bei der zweiten Schneckensammlung 2018 wiederholt. Die Mittelwerte der Temperatur ($29,4^\circ\text{C} \pm 3,3$), des pH-Wertes ($7,75 \pm 0,75$), der Leitfähigkeit ($0,065 \text{ mS} \pm 0,5$) und des Salzgehaltes ($0,036\% \pm 0,028$) waren 2018 höher als 2016. Ein Vergleich dieser Parameter zwischen den beiden Jahren zeigte keine signifikanten Ergebnisse (Temperatur: $t = -1,01$, $p = 0,328$; pH: $t = -1,929$, $p = 0,073$; Leitfähigkeit: $t = -1,592$, $p = 0,132$; Salzgehalt: $t = -1,831$, $p = 0,087$). Allerdings konnte 2018 eine signifikante Korrelation zwischen Schneckenhäufigkeit und pH-Wert ($r_s = -0,793$, $p < 0,001$, $n = 16$), Schneckenhäufigkeit und Salzgehalt ($r_s = 0,512$, $p = 0,043$, $n = 16$), sowie

Schneckenhäufigkeit und Leitfähigkeit ($r_s = 0,499$, $p = 0,049$, $n = 16$) ermittelt werden. 2016 konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen diesen Parametern und der Schneckenhäufigkeit festgestellt werden. In Tabelle 22 sind die mittleren Wasserwerte der beiden Untersuchungszeitpunkte zusammengefasst.

Tabelle 22 Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) der Wasserparameter zu beiden Messzeitpunkten.

Wasserparameter	Wasserwerte 2016 (\pm SD)	Wasserwerte 2018 (\pm SD)
Temperatur (°C)	28,5 (1,6)	29,4 (3,3)
pH-Wert	7,16 (0,77)	7,75 (0,75)
Salzgehalt (%)	0,41 (0,2)	0,65 (0,5)
Leitfähigkeit (mS)	0,021 (0,009)	0,036 (0,028)
gelöster Sauerstoff (mg/L)	7,0 (2,83)	7,0 (1,03)

5. Diskussion

5.1 Studie zum Nachweis von *S. mansoni* DNA in Stuhlproben mittels Real-Time PCR

Diese Studie wurde durchgeführt, um die diagnostische Genauigkeit der parasitologischen KK-Methode, des POC-CCA-Schnelltests und der Real-Time PCR aus Stuhlproben zu vergleichen. Als Referenzmethode wurde einerseits die von der WHO empfohlene KK-Methode verwendet, andererseits die LCA. Sowohl der Schnelltest als auch die Real-Time PCR zeigten sehr hohe Sensitivitäten (> 96%) aber geringe Spezifitäten (< 30%) bei Verwendung der KK-Methode als Standard. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die geringe Sensitivität der mikroskopischen Nachweismethode und den dadurch vermutlich falsch-negativ ermittelten Ergebnisse sein. Diverse Studien konnten zeigen, dass die Sensitivität der KK-Methode, insbesondere bei leichten Infektionen nicht zufriedenstellend ist [164]. Die Analyse der Daten der vorliegenden Studie mithilfe der LCA zeigte, dass das parasitologische Verfahren im Vergleich zu den beiden anderen Methoden die geringste Sensitivität aufwies. Gleichzeitig konnte eine sehr hohe Sensitivität für den POC-CCA-Test (99,5%) und die Real-Time PCR (98,7%) ermittelt werden. Zahlreiche Studien zur Performance des urinbasierten Schnelltests in endemischen Regionen demonstrierten ebenfalls eine dem KK-Test überlegene Sensitivität [46,197,209,210]. Die Ergebnisse des POC-CCA-Tests scheinen von den Ergebnissen der KK-Methode nicht abzuweichen, wenn die durch das KK-Verfahren diagnostizierte Prävalenz der Bevölkerung über 50% ist. Bei niedrigeren KK-Prävalenzen können die durch den POC-CCA-Test detektierten Infektionen wesentlich höher sein [211]. Allerdings ist der mikroskopische Nachweis der Eier von *S. mansoni* hochspezifisch, wohingegen beim Schnelltest falsch-positive Reaktionen durch Harnwegsinfektionen, Hämaturie, den Einsatz von Diuretika usw. auftreten können [212]. Dadurch besteht bei dieser Methode die Gefahr der Überschätzung der tatsächlichen Prävalenz. In der vorliegenden Studie waren die positiven Proben überrepräsentiert. Da die Testevaluation von der Prävalenz der Infektion beeinflusst wird, sollten weitere Untersuchungen zur Güte der Tests in Regionen mit geringerer Prävalenz folgen. In der vorliegenden Studie wurden Infektionen mit *S. haematobium* über ein zweistufiges Testverfahren nachgewiesen, wobei nur Hämaturie-positive Proben mikroskopisch weiteruntersucht wurden. Leichte Infektionen könnten dabei möglicherweise übersehen worden sein aber zu einer positiven Reaktion im Schnelltest geführt haben. Dies muss bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden, denn zum Vergleich der Methoden sollten die Infektionen mit *S. haematobium* bekannt sein. Die Ergebnisse einiger Studien deuten allerdings darauf hin, dass der POC-CCA-Test zur Diagnose der urogenitalen Schistosomiasis nicht gut geeignet ist [103,211,213]. Übereinstimmend mit anderen Studien konnte in der

vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Sensitivität des Schnelltests bei geringerer Intensität der Infektion abnimmt (Abbildung 6) [87,214,215]. Die Farbintensität der POC-CCA-Testbande wies eine starke Korrelation mit der Zahl EPG Stuhl auf, welche durch die KK-Methode bestimmt wurde. Dies bestätigt die Ergebnisse früherer Untersuchungen [197,216]. Zudem wurde durch die negative Korrelation der C_T -Werte mit den EPG Stuhl demonstriert, dass die Methode der Real-Time PCR zur Ermittlung der Infektionsintensität herangezogen werden kann (Abbildung 5). Dieser Zusammenhang begründet sich vermutlich dadurch, dass die in den Stuhlproben nachgewiesene DNA höchstwahrscheinlich aus Eiern stammt [217]. Espírito-Santo *et al.*, konnten bei ihren Analysen allerdings keinen Zusammenhang zwischen den C_T -Werten und der Anzahl EPG Stuhl finden [218]. Die hier verwendete Real-Time PCR zeigte keine höhere Sensitivität als der POC-CCA-Test. In drei KK-positiven Proben konnte keine DNA von *S. mansoni* detektiert werden. Möglicherweise wurde dies durch vertauschte oder falsch beschriftete Proben verursacht. Durch PCR-Methoden falsch-negativ ermittelte Ergebnisse wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [219,220]. Als Ursachen werden oftmals chemische Komponenten der Stuhlproben genannt, die einen inhibitorischen Effekt auf die Amplifikationsreaktion haben, mögliche Degradation der DNA während des Transports oder der Lagerung der Proben sowie Schwankungen in der Zahl ausgeschiedener Eier und eine ungleichmäßige Verteilung der Eier im Stuhl [220]. Eine Hemmung der PCR-Reaktion konnte in der vorliegenden Studie ausgeschlossen werden, da eine interne Inhibitionskontrolle verwendet wurde. Darüber hinaus wurde keine klassische PCR sondern eine Real-Time PCR-Technik verwendet, um Kontaminationen und ein Post-PCR-Handling zu vermeiden. Hinsichtlich der Spezifität erzielten die Real-Time PCR und die KK-Methode die höchsten Werte. In einer ähnlichen Studie von Al-Shehri *et al.*, wurden die höchsten Spezifitäten hingegen beim POC-CCA-Test und der KK-Methode ermittelt [196].

Insgesamt konnte durch die vorliegenden Analysen gezeigt werden, dass der POC-CCA-Test ein gut geeigneter Test zum Nachweis von *S. mansoni*-Infektionen in endemischen Gebieten darstellt. Im Vergleich zur Real-Time PCR zeigten sich nur geringe Unterschiede. Auch in Regionen mit geringer Prävalenz und Intensität scheint die durch den POC-CCA ermittelte Prävalenz höher zu sein als durch die Verwendung der KK-Methode [211]. Dies konnte durch Untersuchungen von Vorschul- und Schulkindern in Regionen mit geringer Prävalenz bestätigt werden [221]. Dadurch das mit dem mikroskopischen Nachweisverfahren neben der qualitativen auch eine quantitative Analyse möglich ist und gleichzeitig andere Geohelminthen nachgewiesen werden können, wird diese Technik in Feldstudien oft bevorzugt auch wenn die Sensitivität geringer ist als bei anderen Testmethoden [222]. Obwohl die Real-Time PCR eine sehr gute Sensitivität und die höchste Spezifität unter den 3 verwendeten Tests aufwies, ist diese Methode nur bedingt für den Einsatz im Feld geeignet. Der größte Nachteil ist das

erforderliche Equipment und speziell geschultes Laborpersonal. Trotzdem stellt die PCR ein nützliches zusätzliches Instrument dar, um die klassischen Methoden zu überprüfen oder leichte Infektionen von *S. mansoni* zu detektieren.

5.2 Studie zum Nachweis von *S. mansoni* DNA in Urinproben, Serum und *dried blood spot cards* mittels Real-Time PCR

5.2.1 Verwendung der serumbasierten Real-Time PCR zum Nachweis von *S. mansoni* DNA vor und nach Behandlung mit Praziquantel

In dieser Studie wurde der Nachweis zirkulierender DNA von *S. mansoni* in Serum- und Urinproben mit der Methode der Real-Time PCR als alternatives Diagnoseverfahren zum mikroskopischen KK-Verfahren bzw. des urinbasierten POC-CCA-Tests untersucht. Zirkulierende freie *Schistosoma*-DNA kommt in geringen Konzentrationen als Abbauprodukt von parasitären Zellen im Blutkreislauf vor und ist homogen in Plasma und anderen Körperflüssigkeiten des Wirtes verteilt [119,185,223,224]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die meisten Infektionen durch die serumbasierte Real-Time PCR (75%) nachgewiesen werden konnten, gefolgt vom POC-CCA-Test (63,9%). Mit der urinbasierten Real-Time PCR wurden vergleichsweise wenig *S. mansoni*-positive Proben identifiziert (30,6%). Um die diagnostische Genauigkeit der verwendeten Methoden zu bestimmen, wurde als „Goldstandard“ eine Kombination der mikroskopischen und serumbasierten Real-Time PCR Ergebnisse verwendet. Dazu wurde für beide Methoden eine Spezifität von 100% angenommen. Diese Vorgehensweise wurde bereits in anderen Studien überprüft und angewendet [46,198]. Die serumbasierte Real-Time PCR erzielte im Vergleich zu den anderen Testmethoden die höchste Sensitivität (96,3%), während die urinbasierte Real-Time PCR die niedrigste Sensitivität (33,3%) und die niedrigste Übereinstimmung mit der kombinierten Referenz ($k = 0,119$) aufzeigte. In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass zellfreie DNA die Nierenbarriere des Menschen passieren kann. Im Urin von mit männlichem Blut transfundierten Frauen als auch bei Frauen, die mit männlichen Föten schwanger waren, konnten mänderspezifische DNA Sequenzen nachgewiesen werden [225]. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass zirkulierende zellfreie DNA im Blut als transrenale DNA-Fragmente von ca.150-300 bp Größe im Urin erscheinen [226]. Der Nachweis von *S. mansoni*-spezifischer DNA im Urin wurde in anderen Forschungsgruppen bereits erfolgreich durchgeführt [99,127,227,228]. In unseren Analysen konnte ebenfalls zellfreie DNA von *S. mansoni* im Urin detektiert werden, die Methode wies aber im Vergleich zu den anderen angewandten Tests die geringste diagnostische Güte auf. Die DNA im Urin wurde zum Schutz vor Degradation mit einem speziellen Reagenz stabilisiert, möglicherweise war diese Art der Konservierung nicht effektiv genug. Vielversprechende Ergebnisse zur Konservierung der DNA wurden von Lodh *et al.* mit gefilterten Urinproben und anschließender Trocknung der

Filterpapiere [87,125] erzielt. Aufgrund der in dieser Arbeit unzureichenden Ergebnisse der urinbasierten Real-Time PCR wurde zur Verlaufsbeobachtung nach der Behandlung mit Praziquantel nur die serumbasierte PCR-Methode herangezogen. Zwanzig Wochen nach der einmaligen Therapie konnten mit diesem Verfahren 58,3% *S. mansoni* positive Proben ermittelt werden, mit der KK-Methode wurde hingegen keine Infektion festgestellt. Für diese Diskrepanz können mehrere Faktoren ursächlich sein. Erstens deutet die geringe Sensitivität der Mikroskopie (44,4%) daraufhin, dass Proben in denen keine Eier nachgewiesen werden konnten falsch negativ waren. Zweitens sind in hochendemischen Regionen schnelle Reinfektionen möglich. Die Dauer vom Eindringen der Larve in den menschlichen Körper bis zur Eiablage der adulten Würmer beträgt etwa 5-7 Wochen [1]. In dieser Präpatenzzeit können zwar noch keine Eier nachgewiesen werden, der Nachweis von Schistosomen-DNA kann aber durch die hochempfindliche Real-Time PCR-Technik bereits erfolgen. Da jedoch 20 Wochen nach der Behandlung mit PZQ mikroskopisch keine Eier nachgewiesen werden konnten, deutet dies auf eine eher langsame Dynamik der Reinfektion an dieser Übertragungsstelle hin. Drittens wurde in einigen Studien eine verminderte Wirksamkeit von PZQ beobachtet, sodass mehrere Autoren die Frage aufwerfen, ob die Effektivität von diesem Arzneimittel zur Behandlung der Schistosomiasis so hoch ist wie bisher angenommen [149,156,223,229]. Die Beurteilung der Wirksamkeit des Medikamentes erfolgt konventionell mit dem bekanntermaßen nicht hochsensitiven KK-Verfahren, sodass diese gegebenenfalls überbewertet wurde. Die Real-Time PCR-Methode könnte ein nützliches Instrument zur Beantwortung dieser Frage sein. Die letzten beiden hier dargelegten Gründe für den Unterschied der PCR-Resultate und den mikroskopischen Ergebnissen könnten auch die 33,3% positiven POC-CCA-Testresultate in unserer Studie erklären. Lamberton *et al.* verglichen die Sensitivität des POC-CCA-Tests und der KK-Methode nach der medikamentösen Therapie und konnten zeigen, dass der POC-CCA-Test sowohl 4 Wochen als auch 6 Monate nach der PZQ-Behandlung empfindlicher als sechs KK-Slides war [230].

In der vorliegenden Studie konnten wir eine Woche nach Behandlung mit PZQ einen Abfall des C_t -Wertes (Median $C_t = 28$) und zwanzig Wochen später einen Anstieg des C_t -Wertes (Median $C_t = 34,9$) beobachten. Da der C_t -Wert umgekehrt proportional zur Menge an DNA im Ausgangsmaterial ist, konnten Rückschlüsse zur Menge frei zirkulierender *S. mansoni* DNA gezogen werden. Die Verringerung des C_t -Wertes eine Woche nach Therapie, deutete auf einen Anstieg freier DNA hin. Diese stammte vermutlich von adulten Würmern, die durch die Therapie abgetötet wurden und zu einem signifikanten Anstieg der DNA-Konzentration im Körper führte [126]. Der nachfolgende Anstieg des C_t -Wertes bei der zweiten Nachuntersuchung deutete auf eine geringere DNA-Menge im Körper hin. Die C_t -Werte waren hier höher als zu Studienbeginn (Median $C_t = 30,3$). Dies spricht dafür, dass hier die geringste DNA-Menge im Körper vorlag. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Studien berichtet

[126,231]. Ob die DNA, die Wochen nach der Behandlung detektiert wurde, von noch lebenden Würmern, Larvenstadien oder Eiern stammte oder bereits Reinfektionen anzeigte, konnte nicht verifiziert werden. Bei Menschen mit einer chronischen Infektion verbleibt eine große Anzahl der Eier im Gewebe. Aus diesen wird vermutlich über einen längeren Zeitraum DNA freigesetzt, sodass die zirkulierende DNA auch mehrere Monate nach erfolgreicher Therapie nachgewiesen werden kann [224,232]. In einer Studie zum Nachweis von *S. japonicum* mittels klassischer PCR konnte 6-8 Wochen nach der Behandlung mit Praziquantel keine DNA des Parasiten mehr nachgewiesen werden [233]. Ein Zusammenhang zwischen dem C_t -Wert und der Anzahl der Eier in den Stuhlproben konnten in dieser, ebenso wie in zahlreichen anderen Studien nicht gefunden werden [217,218]. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Methode der Real-Time PCR *S. mansoni* spezifische DNA aus allen Phasen des Lebenszyklus detektiert. Eine positive PCR-Reaktion beweist zwar, dass die DNA des Parasiten vorhanden ist, aber nicht, ob sie von adulten Würmern, Eiern oder Larvenstadien stammt [217].

In Anbetracht eines fehlenden Diagnosestandards wurde in dieser Studie zwei Testmethoden zu einer künstlichen Referenz kombiniert. Da damit die Tests bis zu einem gewissen Grad, anhand ihrer eigenen Ergebnisse bewertet wurden, ist nur eine eingeschränkte Interpretation der Daten möglich. Trotz dessen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Methode der serumbasierten Real-Time PCR durch ihre hohe Sensitivität in einer Vielzahl von Situationen einen diagnostischen Mehrwert darstellen kann. Die Methode lässt die Diagnose der Schistosomiasis schon in einem sehr frühen Infektionsstadium zu und kann Infektionen mit geringer Intensität sicher nachweisen. Dies könnte besonders für Reiserückkehrer und Migranten nützlich sein, um mögliche chronische Komplikationen einer nicht erkannten Krankheit zu vermeiden oder auch um Kontrollmaßnahmen langfristig zu überwachen. Dennoch wird das molekulare Nachweisverfahren in endemischen Gebieten die KK-Methode oder den POC-CCA-Test aufgrund der einfachen und schnellen Durchführbarkeit nicht ersetzen können. Eine Alternative hierzu könnte die isothermale LAMP-Methode sein, die keinen Thermocycler erfordert und somit auch in ressourcenarmen Umgebungen eingesetzt werden kann. Ein Problem dieser Technik ist allerdings das häufige Auftreten falsch-positiver Ergebnisse, welche durch Kontaminationen verursacht werden [79].

5.2.2 Nachweis von *S. mansoni* spezifischer DNA mittels Real-Time PCR aus Serumproben im Vergleich zu *dried blood spot cards*

Die Entnahme, der Transport und die Lagerung von Blutproben sind in abgelegenen tropischen Gebieten oft suboptimal [234]. Deshalb war das Ziel dieser Studie konservierte Blutproben in Form von DBSs als DNA-Quelle für die molekulare Analyse zu untersuchen. Im Vergleich zur kombinierten Referenz konnte bei der Verwendung der DBS als Ausgangsmaterial für die Real-Time PCR jedoch nur eine Sensitivität von 45,4% ermittelt

werden, bei gefrorenen Serumproben 95,4%. Darüber hinaus waren die ermittelten C_T -Werte bei Verwendung der DBSs (Median 37,3) signifikant höher als bei den Serumproben (Median 27,5, $p < 0,001$). Dies deutet darauf hin, dass die Konzentration parasitenspezifischer DNA im für die PCR Reaktion eingesetzten Template bei den Filterkarten geringer war als im Serum. Dies könnte auf die geringe Menge Blut die zur Anfertigung der DBSs benötigt wurde bzw. das geringe Volumen, welches für den Extraktionsprozess verwendet wurde, zurückzuführen sein. Das Extraktionsprotokoll für Serum wurde mit einem Volumen von 2 ml Serum durchgeführt. Zur Anfertigung eines DBS wurden jedoch nur 125 μ l Blut und zur Extraktion acht ausgestanzte Kreise eines Spots (je 6 mm) verwendet. Eine Filterscheibe mit einem Durchmesser von 6 mm enthält ca. $8,7 \pm 1,9 \mu$ l Blut [234]. Demzufolge wurde hier zur Extraktion nur ca. 80 μ l Blut verwendet. Dieser quantitative Unterschied könnte zu der hohen Rate falsch-negativer Ergebnisse geführt haben.

Da DBSs den Transport und die Lagerung von Blutproben stark vereinfachen, sind sie in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt. Für die Herstellung ist keine Venenpunktion, sondern lediglich ein Stich in die Fingerbeere von Nöten [234,235]. Darüber hinaus ist für die Aufbewahrung keine Kühlkette notwendig [235,236]. Daher könnten sie eine wertvolle alternative Probenquelle darstellen und die Anwendbarkeit der DNA-basierten Diagnose der Schistosomiasis im Feld vereinfachen. Dennoch hat sich das DBS-basierte Real-Time PCR-Verfahren in unserer Studie nicht bewährt und kann ohne weitere umfassende Analysen nicht empfohlen werden. Es ist bekannt, dass DNA Degradation auch in DBSs auftreten kann und diagnostische Assays dadurch beeinträchtigt werden [236–239]. Daher sollten weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen Lagerungsbedingungen (Luftfeuchtigkeit und Temperatur), Lagerdauer und verschiedenen Filterpapiersorten durchgeführt werden, um zu eruieren inwieweit dies die Ergebnisse molekularer Nachweisverfahren beeinflusst.

5.2.3 Performance der KK-Methode, des POC-CCA-Tests und der serumbasierten Real-Time PCR abhängig vom HIV-Status

Wie in zahlreichen Studien zuvor, konnte in der vorliegenden Arbeit eine verminderte Ausscheidung von *S. mansoni*-Eiern bei der HIV-koinfizierten Patientengruppe festgestellt werden [174,240–242]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Versuchen mit immundefizienten Mäusen beschrieben [243,244]. In diesen Modellen konnte gezeigt werden, dass bei immungeschwächten Mäusen die Reifung des Wurms verzögert, die Fruchtbarkeit des Weibchens beeinträchtigt und die Transposition der Eier in das Darmlumen reduziert war, sodass trotz gleicher Anzahl Würmer im Körper weniger Eier ausgeschieden wurden [243–247]. Im Gegensatz dazu deuten die Ergebnisse anderer Autoren darauf hin, dass sich

die Eizahlen nicht zwischen HIV-positiven und HIV-negativen Individuen unterscheiden [174,240].

Im Kontrast zu den Eizahlen konnte in der aktuellen Arbeit kein Unterschied zwischen den mittleren C_t -Werten der Real-Time PCR gefunden werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Leistung des parasitologischen KK-Verfahrens im Gegensatz zur Real-Time PCR in diesem Kontext beeinträchtigt ist. Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede in der Empfindlichkeit der Testsysteme zwischen der HIV-positiven und HIV-negativen Subgruppe beobachtet werden. Sowohl in der gesamten Studiengruppe als auch in der HIV-positiven Kohorte erzielten die serumbasierte Real-Time PCR und der POC-CCA-Test eine höhere Sensitivität und Spezifität als das mikroskopische Nachweisverfahren. Colombe *et al.* deuten in ihrer Studie darauf hin, dass die Sensitivität der Mikroskopie nicht nur durch den HIV-Status, sondern auch durch das Geschlecht beeinflusst werden kann [248]. Einerseits zeigten deren Ergebnisse, dass HIV-infizierte Personen weniger Schistosomen-Eier ausscheiden als HIV-uninfizierte Personen und andererseits, dass Frauen weniger Eier ausscheiden als Männer, unabhängig vom HIV-Status [248].

Aufgrund der geringen Studiengröße ist bei der Interpretation der hier vorliegenden Ergebnisse Vorsicht geboten. Dennoch unterstützen sie die Empfehlungen anderer Autoren alternative diagnostische Tests, wie z.B. den POC-CCA-Test in erwachsenen Bevölkerungsgruppen mit hoher HIV-Infektionsrate zu verwenden [248,249]. Aufgrund der Tatsache dass die C_t -Werte der Real-Time PCR nicht durch den HIV-Status beeinflusst wurden, könnte diese Methode als zusätzliches Diagnostik-Tool für HIV-Patienten mit zuvor unklarem Ergebnis bezüglich einer Schistosomiasis sein.

5.3 Malakologische Studie auf der Insel Ijinga

5.3.1 *Baseline*-Screening der humanen Bevölkerung und des Schneckenzwischenwirtes

Die Prävalenz von *S. mansoni* war sowohl in allen Altersgruppen der menschlichen Bevölkerung als auch in der Schneckenpopulation sehr hoch. Dass die Gemeinschaften entlang der südlichen Uferlinie des Viktoriasees und seinen Inseln eine sehr hohe Prävalenz von Schistosomiasis aufweisen, wurde bereits in früheren Studien beobachtet [75,174–176,250]. Es konnte ebenfalls zuvor festgestellt werden, dass die Zwischenwirtschnecken der Gattung *Biomphalaria* in verschiedenen Lebensräumen entlang des Viktoriasees weit verbreitet sind [23,31,205,214]. Die zahlreich gefundenen *Biomphalaria* auf der Insel Ijinga bestätigen diese Daten. Es ist anzunehmen, dass die von der Bevölkerung häufig aufgesuchten Wasserstellen potenzielle Übertragungs-Hotspots für die intestinale Schistosomiasis sind.

Zur Ermittlung der Prävalenz von *S. mansoni* bei der Inselbevölkerung wurden die KK-Technik und der POC-CCA-Test verwendet. Mit beiden Methoden konnte eine sehr hohe Prävalenz detektiert werden, wobei durch den Schnelltest mehr Infektionen nachgewiesen wurden (94,5%) als durch das mikroskopische Nachweisverfahren (68,9%). In anderen nahegelegenen Studienorten konnten zum Teil noch höhere Prävalenzen, z.B. auf der Insel Ukerewe mit 78% [176] bzw. 86,3% [75] (basierend auf der KK-Methode) zum Teil aber auch geringere Prävalenzen [174,250] detektiert werden. Die Unterschiede in der Prävalenz hinsichtlich Alter und Geschlecht waren mit den Ergebnissen ähnlicher Studien vergleichbar [176,251] und sind hauptsächlich auf die ungleiche Exposition mit zerkarienhaltigem Wasser und die Entwicklung einer partiellen Immunität zurückzuführen [60,75,251].

Die Prävalenz von *S. mansoni* war zwar in allen Altersgruppen sehr hoch (> 50%), aber besonders alarmierend war die Häufigkeit der Erkrankung bei Kindern im Vorschulalter (≤ 5 Jahre). Die mit der KK-Methode diagnostizierte Prävalenz lag hier bei 54,9%, mit dem POC-CCA-Schnelltest bei 95,8%. Der höchste Mittelwert der EPG Stuhl wurde bei der Altersgruppe 6-15 ermittelt (108,6 EPG) gefolgt von den Vorschulkindern (91,9 EPG). Ähnliche Daten wurden in Ostafrika gewonnen [252,253]. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Infektionen mit *S. mansoni* bereits in sehr jungen Jahren erworben werden können. Durch die hohen Infektionsintensitäten wird die Entwicklung einer hepatosplenischen Ausprägung begünstigt und tritt mit hoher Wahrscheinlichkeit auf wenn diese Kinder unbehandelt bleiben [254]. Die Verwendung der KK-Methode alleine führt allerdings oftmals zu einer Unterschätzung der wahren Prävalenz in dieser Altersgruppe, sodass die kombinierte Anwendung des POC-CCA-Tests empfohlen wird [252,255]. In der vorliegenden Studie wurden mit dem KK-Test nahezu 41% der Vorschulkinder als falsch-negativ diagnostiziert. In den WHO-Leitlinien zur Bekämpfung der Schistosomiasis werden Kinder im Vorschulalter nicht berücksichtigt, weil die sichere Verabreichung von Praziquantel bei Kindern unter vier Jahren nicht erwiesen ist und es derzeit keine geeignete pädiatrische Formulierung gibt [256]. In einer aktuellen Studie zum Vergleich verschiedener PZQ-Dosierungen wurde jedoch festgestellt, dass eine einzelne Gabe von 40 mg/kg Körpergewicht bei Kindern unter 5 Jahren sicher und wirksam ist [256]. An einem praziquantelhaltigem Therapeutikum für Kinder wird derzeit gearbeitet [254,257,258]. Dies würde die Aufnahme in Massenbehandlungsprogramme ermöglichen, aber gleichzeitig einen empfindlicheren diagnostischen Test zum Nachweis der Schistosomiasis in dieser Altersgruppe und zur Kontrolle der Wirksamkeit des Medikaments erfordern [254].

Insgesamt betrachtet verdeutlichen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Insel Ijinga hochendemisch für *S. mansoni* ist, was sich auch in der hohen Anzahl mit *S. mansoni* infizierter *Biomphalaria* widerspiegelt (35,4%).

Die Analyse der Schnecken erfolgte ebenfalls über einen DNA Nachweis des Parasiten mithilfe der Real-Time PCR. Dieses Verfahren konnte bereits in mehreren Studien zur Detektion infizierter Schnecken eingesetzt und den Wert dieser Analysen als Kontrollinstrument für Eliminationsmaßnahmen verdeutlicht werden [90,134,259,260]. Die Verwendung dieser PCR-basierten Methoden zur Identifizierung von Transmissions-Hotspots hat sich zudem im Vergleich zur klassischen „*Cercarial Shedding*“-Methode als sensitiver erwiesen [189]. In einer Studie von Bakuza *et al.* [261] konnte ebenfalls eine hohe Anzahl infizierter Schnecken (47%) über den PCR-Nachweis identifiziert werden. Ähnlich zur vorliegenden Arbeit wurden auch von dieser Forschergruppe zur genaueren Analyse Sequenzanalysen durchgeführt. Durch diese konnte bestätigt werden, dass die meisten Infektionen durch *S. mansoni* verursacht wurden, wobei aber auch andere Trematoden nachgewiesen werden konnten. Diese Ergebnisse heben die Wichtigkeit der zusätzlichen Überprüfung der Parasitenart durch Sequenzierung hervor, da die Verbindungen zwischen Schnecken und Trematoden vielfältiger sein könnten als bisher bekannt ist [261]. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Schnecken der Gattung *Biomphalaria* sowohl von *S. mansoni* als auch von der Schwesternart *S. rodhaini* infiziert werden können [262] und bei der Verwendung von SM 1-7 als Zielsequenz für die molekulare Analyse Kreuzreaktionen möglich sind. Die in der vorliegenden Arbeit sequenzierten PCR-Amplikons zeigten alle eine sehr hohe Übereinstimmung mit *S. mansoni*. Bei einer in Westkenia durchgeführten Studie wurde herausgefunden, dass die analysierten Schnecken achtmal häufiger mit *S. mansoni* infiziert waren als mit *S. rodhaini* [263]. Begründet wurde dieses ungleiche Verhältnis mit der unterschiedlichen Verbreitung und Lebensdauer der Endwirte. Nagetiere, welche typische Endwirte für *S. rodhaini* darstellen, haben eine kürzere Lebensdauer und bestehen im Allgemeinen aus kleineren, unterteilten und nicht so weit verbreiteten Populationen. Daher dient der Mensch für *S. mansoni* als stabileres Reservoir [263]. Dies zeigt sich auch in der genetischen Vielfalt, wobei *S. mansoni* im Vergleich zu *S. rodhaini* variationsreicher auftritt [263]. Mittlerweile wurde eine PCR entwickelt, die eine Differenzierung von *S. mansoni* und anderen relevanten *Schistosoma*-Arten ermöglicht und anhand der Amplikongröße eine Unterscheidung von *S. mansoni* und *S. rodhaini* zulässt [264]. Dieser Assay, der auf das ND5-Gen von *S. mansoni* abzielt, könnte für zukünftige malakologische Analysen auf der Insel Ijinga hilfreich sein. Es ist wichtig genau zu unterscheiden womit die Schnecken infiziert sind, da tierpathogene *Schistosoma*-Arten vermutlich nicht durch eine abnehmende Prävalenz der Schistosomiasis in der menschlichen Bevölkerung beeinflusst werden und die Infektionen des Zwischenwirtes mit diesen Parasiten wahrscheinlich auf einem hohen Niveau bleiben.

Die Bewohner Ijingas haben zwar in den Befragungen angegeben, dass die Wasserstellen nicht zur Defäkation genutzt wurden, es ist aber dennoch anzunehmen, dass die Rate infizierter Schnecken auf den Grad der Kontamination mit parasitären Eiern zurückgeht. Die in

dieser Arbeit verwendete DNA-Nachweismethode zielte einzig darauf ab, die DNA des Parasiten im Zwischenwirt nachzuweisen. Eine Unterscheidung zwischen präpatenter (es werden noch keine Zerkarien ausgeschieden) und patenter Infektion (Zerkarien werden ausgestoßen) war nicht möglich [133,134]. Aufgrund dessen können zwar Annahmen über die Transmission vom Menschen zur Schnecke formuliert werden, es ist jedoch nicht möglich Aussagen über die direkte Gefahr einer Infektion durch Zerkarien im Wasser zu machen.

Um mögliche Habitatpräferenzen der Zwischenwirtschnecken zu ermitteln, wurden an allen Sammelstellen auf der Insel Ijinga zusätzlich eine Reihe von Wasserparametern gemessen und die Vegetation dokumentiert. In früheren Studien entlang der Ufer des Viktoriasees konnte ein Zusammenhang zwischen der Vegetation und der Häufigkeit von *B. sudanica* beobachtet werden [23,265]. Diese Schneckenart ist häufig in der Ufervegetation, wie z.B. an Wasserhyazinthen oder in temporären sumpfigen Gebieten um den See zu finden [205,266]. Laut einer Untersuchung von Ofulla *et al.* [265] scheint die Verbreitung dieser Art mehr mit Wasserhyazinthen als mit Gras assoziiert zu sein. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Assoziation von *B. sudanica* mit Gräsern festgestellt werden. Ein Zusammenhang zwischen der Wassertemperatur und der Schneckenhäufigkeit konnte in dieser und anderen Studien nicht nachgewiesen werden [72,267]. Vermutlich ist dies auf den schmalen Temperaturbereich im Untersuchungsgebiet auf Ijinga zurückzuführen, denn in zahlreichen anderen Studien aus Uganda, Kenia und Tansania konnten signifikante Korrelationen zwischen der Wassertemperatur und der Häufigkeit der Schnecken im jeweiligen Habitat nachgewiesen werden [23,268,269]. Zudem wurde in einer Studie ein negativer Zusammenhang zwischen dem pH-Wert und der Schneckenverteilung berichtet, wobei die Zwischenwirte in eher sauren Lebensräumen gefunden wurden [205]. Dies konnte durch die Ergebnisse anderer Autoren und der vorliegenden Analyse ebenfalls nicht bestätigt werden [268].

Es ist wichtig zu erwähnen, dass die gesammelten Schnecken der hier dargestellten Untersuchungen nur anhand morphologischer Merkmale identifiziert wurden und dies keine absolut zuverlässige Speziesdifferenzierung ermöglicht. Kürzlich konnte durch molekulare Analysen gezeigt werden, dass *B. sudanica* und *B. choanomphala* eine größere genetische und morphologische Vielfalt aufweisen als bisher angenommen [266]. Beide Arten gehören jedoch zu den wichtigsten Zwischenwirten von *S. mansoni* entlang der Uferregion des Viktoriasees [21,22,31].

5.3.2 Untersuchungen der Sentinelgruppe und malakologische Analyse nach 4 Behandlungsrunden der humanen Bevölkerung

Das Ziel von Massenbehandlungsprogrammen gegen Schistosomiasis ist eine Reduzierung der Morbidität und Mortalität in der Bevölkerung. Da die behandelten Individuen weniger Eier

der Parasiten ausscheiden, führt dies gleichzeitig zu einer verminderten Umweltkontamination und dadurch zu einem geringeren Reinfektionsrisiko [190]. Analysen der Zwischenwirte hinsichtlich Infektionen mit *Schistosoma* vor und nach Kontrollinterventionen könnten genutzt werden, um die Veränderungen in der Übertragung zwischen Mensch und Schnecke beurteilen zu können [134]. Deshalb wurden in der vorliegenden Studie sowohl die Prävalenz der Bevölkerung als auch der gesammelten Schnecken der Gattung *Biomphalaria* nach einem intensivierten Behandlungsprotokoll überprüft. Da die Infektionen mit *Schistosoma spp.* ihren Höhepunkt in der Kindheit erreichen und dazu führen, dass Kinder im schulpflichtigen Alter mehr Infektionen tragen als andere Mitglieder der Gesellschaft [1], wurde diese Altersgruppe als Sentinelgruppe, zur regelmäßigen Kontrolle des Behandlungserfolges gewählt. Die Verabreichung der ersten drei monatlichen Medikationen führte zu einer Senkung der Prävalenz auf 3,6% (KK-Methode) bzw. 12,6% (POC-CCA-Test). Trotz der mehrmaligen Behandlung mit PZQ konnten weiterhin Infektionen nachgewiesen werden. Da die Insel Ijinga eine hochendemische Region für *S. mansoni* darstellt, ist anzunehmen das einige infizierte Kinder während der jeweiligen Behandlungsrunden sowohl reife Würmer als auch Schistosomula oder unreife Würmer in sich trugen, auf die PZQ einen weniger starken Effekt ausübt [156,270,271]. Es ist bekannt, dass das Verhalten und der häufige Wasserkontakt von Kindern zu schnellen Reinfektionen und zu geringeren Heilungsraten führen können [272]. Zudem wurde berichtet das Reinfektionen mit *S. mansoni* schneller erfolgen können als mit *S. haematobium* [273–275]. Innerhalb der vierteljährigen Behandlungspause stieg die Prävalenz basierend auf der KK-Methode wieder auf 19,3% bzw. bei Verwendung des POC-CCA-Tests auf 32,7% an. In Endemiegebieten wo schnelle Reinfektionen die Norm sind, ist dies nicht verwunderlich und zeigt sehr deutlich, dass therapeutische Maßnahmen mit anderen Kontrollinterventionen kombiniert werden sollten um bereits erzielte Erfolge aufrecht zu erhalten und die Reinfektionsraten zu verringern [1]. In einer Studie von Munisi *et al.*, wurden 8 Monate nach einer zweimaligen Behandlung mit PZQ ebenfalls sehr hohe Reinfektionsraten von über 80% festgestellt [276]. Überraschend ist das Ergebnis der Therapiekontrolle sechs Wochen nach der vierten Gabe von Praziquantel, wo ein erneuter Anstieg der Prävalenz zu verzeichnen war (KK-Methode 28,7%, POC-CCA 53,4%). Dies könnte auf unvollständige Heilungen der Infektionen hindeuten, möglicherweise aufgrund gewisser Toleranzen oder Resistenzen der Schistosomen gegenüber Praziquantel [277]. Auch in anderen Studien konnte bei Schulkindern die an mehreren Behandlungsrunden teilnahmen, eine verminderte Wirksamkeit des Arzneimittels festgestellt werden [278]. Kontrollprogramme, in denen regelmäßig Behandlungsrunden durchgeführt werden, sollten deshalb Untersuchungen zur Wirksamkeit des Medikamentes in ihre Programmaktivitäten integrieren [278]. Innerhalb des Pilotprojektes zur Eliminierung der Schistosomiasis auf der Insel Ijinga wurden Daten zur Effektivität von PZQ erhoben und eine Heilungsrate von 99% bzw. eine

Ei-Reduktionsrate von 99,5% ermittelt (unveröffentlichte Daten). Dies spricht gegen eine verminderte Wirksamkeit von PZQ in diesem Studienkollektiv. Da zur Ermittlung dieser Parameter das klassische KK-Verfahren verwendet wurde und dies insbesondere zur Erkennung leichter Infektionen keine hohe Sensitivität aufweist [279,280], könnte dies die Ergebnisse beeinträchtigt und zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Infektionen geführt haben.

Basierend auf der KK-Methode konnte die Prävalenz insgesamt von anfänglich 68,9% auf 28,7% nach vier Behandlungsrunden gesenkt werden. Ähnliche Ergebnisse wurden ebenfalls im Schneckenzwischenwirt festgestellt. Bei der Erstuntersuchung wurden sehr hohe Infektionsraten ermittelt. Interessanterweise sank die Zahl der infizierten *Biomphalaria* nach vier Behandlungsrunden von 46,6% auf 16,8%. Da die hier verwendete Real-Time PCR keine sichere Unterscheidung zwischen den Schwesternarten *S. mansoni* und *S. rodhaini* zulässt [281], wurde ein Drittel der PCR-Amplikone zusätzlich durch Sequenzierung analysiert. Alle getesteten Sequenzen wiesen dabei die höchste Ähnlichkeit mit *S. mansoni* auf, sodass vermutet werden kann, dass die Mehrheit der positiven Real-Time PCR-Reaktionen durch *S. mansoni* und nicht durch *S. rodhaini* verursacht wurden.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die durch die Behandlung mit PZQ verringerte Prävalenz von *S. mansoni* in der menschlichen Bevölkerung in einer verminderten Prävalenz derselben Infektion im Zwischenwirt abzeichnet. Wiederholte Behandlungsrunden führen zu einer reduzierten Eiausscheidung und damit zu einer reduzierten Kontamination der Umwelt. Dadurch sind weniger Mirazidien zur Infektion der Schneckenzwischenwirte vorhanden. Eine aktuelle Studie aus Kenia hat gezeigt, dass die Infektionshäufigkeit von *S. haematobium* im Zwischenwirt *Bulinus* der Prävalenz in der menschlichen Bevölkerung entspricht [133,134]. Somit könnte die Behandlung mit PZQ indirekt auch zu einer abnehmenden Prävalenz von *Schistosoma* in der Schneckenpopulation führen.

Bei den Untersuchungen auf der Insel Ijunga konnte sowohl ein Rückgang der *S. mansoni* Prävalenz in der humanen Bevölkerung als auch bei den Schnecken beobachtet werden. Die Ergebnisse der Sentinelgruppe zeigten, dass die Infektionszahlen nach vier Behandlungsrunden gesunken sind. Dies lässt einen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit der Parasiteninfektion beim Menschen und den Schneckenzwischenwirten vermuten. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in anderen Studien festgestellt [133,134]. Basierend auf diesen Erkenntnissen scheint die Überwachung der Wirksamkeit von Behandlungsprogrammen in endemischen Gebieten durch die Analyse der Zwischenwirtschnecken möglich zu sein. Dies ist insbesondere wichtig, wenn die klassischen parasitologischen Techniken aufgrund geringer Infektionsintensitäten an ihre diagnostischen Grenzen stoßen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist es wichtig zu beachten, dass die aktuelle Studie zahlreiche Einschränkungen aufweist. Die Studie wurde in einem kleinen, abgegrenzten Gebiet durchgeführt und die Teilnehmerate der Bevölkerung an allen vier Behandlungsrunden war außergewöhnlich hoch. Dies kann in anderen Umgebungen anders sein. Darüber hinaus war die Zeitspanne der Schneckensammlungen zwischen der Erst- und Folgeuntersuchung sehr lang. Somit wurden eventuell aufgetretene Umweltveränderungen und mögliche damit einhergehende Änderungen in der Häufigkeit und Infektion der Schnecken nicht erfasst. Darüber hinaus wurden aus Kostengründen nicht alle vor Ort gesammelten *Biomphalaria* analysiert. Dies könnte zu einer Unter- oder Überschätzung der wahren Prävalenz von *S. mansoni* in der Schneckenpopulation geführt haben. Es konnte gezeigt werden, dass die hier verwendete Real-Time PCR-Methode die Identifizierung infizierter Schnecken und Orte intensiver Transmission erlaubt und zudem zur Überwachung des therapeutischen Effekts herangezogen werden kann. Die Technik ist jedoch vergleichsweise teuer und kann nicht direkt im Feld eingesetzt werden. Darüber hinaus ist der Ausschluss von Kreuzreaktionen mit anderen Trematoden über weitere Analysen unabdingbar, da der hier verwendete PCR-Marker entwickelt wurde, als die Vielfalt der in den Zwischenwirten vorkommenden Trematoden noch nicht bekannt war.

Zusammenfassend wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie sehr deutlich, dass Reinfektionen in endemischen Gebieten, trotz mehrfacher Behandlungsrunden sehr schnell erfolgen. Dies unterstreicht die Wichtigkeit eines kombinierten Kontrollansatzes, bei dem die Behandlung mit WASH-Maßnahmen zur Verbesserung der Wasser- und Sanitärbedingungen, Aufklärungskampagnen, Hygieneschulungen usw. einhergehen sollten [282].

6. Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
<i>B. choanomphala</i>	<i>Biomphalaria choanomphala</i>
<i>B. pfeifferi</i>	<i>Biomphalaria pfeifferi</i>
<i>B. sudanica</i>	<i>Biomphalaria sudanica</i>
<i>B. angulosa</i>	<i>Biomphalaria angulosa</i>
<i>B. africanus</i>	<i>Bulinus africanus</i>
<i>B. globosus</i>	<i>Bulinus globosus</i>
<i>B. nasutus</i>	<i>Bulinus nasutus</i>
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAA	zirkulierendes anodisches Antigen (<i>circulating anodic antigen</i>)
CCA	zirkulierendes kathodisches Antigen (<i>circulating cathodic antigen</i>)
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFPD	<i>cell-free parasite DNA</i>
C _T -Wert	Schwellenwertzyklus (<i>threshold cycle</i>)
DBS	<i>dried blood spot</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dsDNA	doppelsträngige DNA (<i>double-stranded desoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPG	Eier pro Gramm (<i>eggs per gram</i>)
g	Gramm
GPS	<i>Global Positioning System</i>
IFAT	Immun-Fluoreszenz-Antikörper-Test

k	Kappa
kg	Kilogramm
KI	Konfidenzintervall
KK-Methode	Kato-Katz Methode
LCA	latente Klassenanalyse (<i>latent class analysis</i>)
L	Liter
LF	<i>lateral flow</i>
LAMP	<i>loop-mediated isothermal amplification</i>
m	Meter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
min	Minute
Mio	Million
mS	Millisiemens
MWEPG	Mittelwert Eier pro Gramm
N	Größe der Grundgesamtheit
n	Anzahl der Merkmalsausprägungen
nM	Nanomolar
NTD	vernachlässigten Tropenkrankheiten (<i>neglected tropical diseases</i>)
NPV	negative Vorhersagewert (<i>negative predictive value</i>)
<i>p</i> -Wert	<i>probabilitas</i> -Wert (Signifikanzwert)
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)

pH	<i>potentia hydrogenii</i> (Wasserstoffionenkonzentration)
POC-CCA	<i>point-of-care circulating cathodic antigen</i>
PZQ	Praziquantel
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
r_s	Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient
s	Sekunde
SAF	Natriumacetat-Eisessig-Formalin (<i>sodium acetate-acetic acid-formalin</i>)
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
<i>S. japonicum</i>	<i>Schistosoma japonicum</i>
<i>S. mekongi</i>	<i>Schistosoma mekongi</i>
<i>S. intercalatum</i>	<i>Schistosoma intercalatum</i>
<i>S. guineensis</i>	<i>Schistosoma guineensis</i>
<i>S. rodhaini</i>	<i>Schistosoma rodhaini</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single-stranded desoxyribonucleic acid</i>)
τ	Kendall-Tau
T_M	Schmelztemperatur
u.a.	unter anderem
UCP	<i>upconverting phosphors</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
WASH	Water, Sanitation and Hygiene
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lebenszyklus von <i>Schistosoma spp.</i> (Quelle CDC)	9
Abbildung 2: Typischer Amplifikationsplot der Real-Time PCR.	30
Abbildung 3: Zusammenhang zwischen der Intensität der POC-CCA Testbande und den Zyklusschwellenwerten (C_t -Werten) der Real-Time PCR	38
Abbildung 4: Zusammenhang zwischen der Intensität der POC-CCA Testbande und der Anzahl Eier pro Gramm Stuhl (EPG) des KK-Tests.....	39
Abbildung 5: Zusammenhang zwischen den Schwellenwerten (C_t -Werten) der <i>S. mansoni</i> -spezifischen Real-Time PCR und der Anzahl Eiern pro Gramm Stuhl (EPG).	39
Abbildung 6: Sensitivität des POC-CCA Urinschnelltests (mit 95% Konfidenzintervallen) bei unterschiedlichen Intensitätsklassen der <i>S. mansoni</i> Infektionen.....	40
Abbildung 7: Vergleich der Real-Time PCR Zyklusschwellenwerte (C_t -Werte) der Serumproben und <i>dried blood spot cards</i> (DBSs)	46
Abbildung 8: Mithilfe der Kato-Katz Methode ermittelte Prävalenz und Intensität der Infektionen (MWEPG) innerhalb der definierten Altersgruppen.....	51
Abbildung 9: Positionen der Schneckensammlung auf der Insel Ijinga.....	53
Abbildung 10: Anzahl der mit <i>S. mansoni</i> infizierten Schnecken an den jeweiligen Sammelstellen auf der Insel Ijinga	54
Abbildung 11: Prävalenz (mit Kato-Katz und POC-CCA Test ermittelt) und Intensität der Infektion (MWEPG) bei den einzelnen Kontrolluntersuchungen.	59

8. Literaturverzeichnis

1. Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *Lancet Lond Engl.* 2014;383: 2253–2264. doi:10.1016/S0140-6736(13)61949-2
2. Eltawil KM, Plassmann M. THEODOR MAXIMILLIAN BILHARZ (1825-1862): THE DISCOVERER OF SCHISTOSOMIASIS. *Int J Parasitol Res.* 2011;3: 17–25. doi:10.9735/0975-3702.3.1.17-25
3. Bella SD, Riccardi N, Giacobbe DR, Luzzati R. History of schistosomiasis (bilharziasis) in humans: from Egyptian medical papyri to molecular biology on mummies. *Pathog Glob Health.* 2018;112: 268. doi:10.1080/20477724.2018.1495357
4. Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Ottesen E, Ehrlich Sachs S, Sachs JD. Incorporating a Rapid-Impact Package for Neglected Tropical Diseases with Programs for HIV/AIDS, Tuberculosis, and Malaria. *PLoS Med.* 3: e102. doi:10.1371/journal.pmed.0030102
5. WHO. Schistosomiasis. [cited 6 Sep 2019]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>
6. Utzinger J, Raso G, Brooker S, De Savigny D, Tanner M, Ørnbjerg N, et al. Schistosomiasis and neglected tropical diseases: towards integrated and sustainable control and a word of caution. *Parasitology.* 2009;136: 1859. doi:10.1017/S0031182009991600
7. WHO | Schistosomiasis: progress report 2001–2011, strategic plan 2012–2020. In: WHO [Internet]. [cited 28 May 2019]. Available: <http://www.who.int/schistosomiasis/resources/9789241503174/en/>
8. Hotez PJ, Kamath A. Neglected Tropical Diseases in Sub-Saharan Africa: Review of Their Prevalence, Distribution, and Disease Burden. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3: e412. doi:10.1371/journal.pntd.0000412
9. Adenowo AF, Oyinloye BE, Ogunyinka BI, Kappo AP. Impact of human schistosomiasis in sub-Saharan Africa. *Braz J Infect Dis.* 2015;19: 196–205. doi:10.1016/j.bjid.2014.11.004
10. Thétiot-Laurent SA-L, Boissier J, Robert A, Meunier B. Chemotherapie gegen Schistosomiasis. *Angew Chem.* 2013;125: 8092–8114. doi:10.1002/ange.201208390
11. Ross AGP, Bartley PB, Sleight AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, et al. Schistosomiasis. *N Engl J Med.* 2002;346: 1212–1220. doi:10.1056/NEJMra012396
12. Mouahid G, Rognon A, de Carvalho Augusto R, Driguez P, Geyer K, Karinshak S, et al. Transplantation of schistosome sporocysts between host snails: A video guide. *Wellcome Open Res.* 2018;3:3. doi:10.12688/wellcomeopenres.13488.1
13. Braun L, Grimes JET, Templeton MR. The effectiveness of water treatment processes against schistosome cercariae: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018; 12: e0006364. doi:10.1371/journal.pntd.0006364
14. Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. *The Lancet.* 2006;368: 1106–1118. doi:10.1016/S0140-6736(06)69440-3
15. Lawson JR, Wilson RA. The survival of the cercariae of *Schistosoma mansoni* in relation to water temperature and glycogen utilization. *Parasitology.* 1980;81: 337–348. doi:10.1017/s0031182000056079

16. Stirewalt MA, Hackey JR. Penetration of Host Skin by Cercariae of *Schistosoma mansoni*. I. Observed Entry into Skin of Mouse, Hamster, Rat, Monkey and Man. *J Parasitol.* 1956;42: 565–580. doi:10.2307/3274873
17. Stirewalt MA, Kruidenier FJ. Activity of the acetabular secretory apparatus of cercariae of *Schistosoma mansoni* under experimental conditions. *Exp Parasitol.* 1961;11: 191–211. doi:10.1016/0014-4894(61)90026-1
18. Gobert GN, Chai M, McMANUS DP. Biology of the schistosome lung-stage schistosomulum. *Parasitology.* 2007;134: 453–460. doi:10.1017/S0031182006001648
19. Zussman RA, Bauman PM, Petruska JC. The Role of Ingested Hemoglobin in the Nutrition of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol.* 1970;56: 75–79. doi:10.2307/3277456
20. Boros DL. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. *Clin Microbiol Rev.* 1989;2: 250–269. doi:10.1128/cmr.2.3.250
21. Magendantz M. The biology of *Biomphalaria choanomphala* and *B. sudanica* in relation to their role in the transmission of *Schistosoma mansoni* in Lake Victoria at Mwanza, Tanzania. *Bull World Health Organ.* 1972;47: 331–341.
22. Gouvras AN, Allan F, Kinung'hi S, Rabone M, Emery A, Angelo T, et al. Longitudinal survey on the distribution of *Biomphalaria sudanica* and *B. choanomophala* in Mwanza region, on the shores of Lake Victoria, Tanzania: implications for schistosomiasis transmission and control. *Parasit Vectors.* 2017; 10: 316. doi:10.1186/s13071-017-2252-z
23. Angelo T, Shahada F, Ayubu K. Population Abundance and Disease Transmission Potential of snail intermediate hosts of Human schistosomiasis in Fishing Communities of Mwanza Region, North-western, Tanzania. *IJSR.* 2014;8: 1230–1236.
24. Lwambo NJ. Transmission of urinary schistosomiasis in Sukumaland, Tanzania. 1. Snail infection rates and incidence of infection in school children. *J Helminthol.* 1988;62: 213–217.
25. Rozendaal JA, Organization WH. Vector control : methods for use by individuals and communities. World Health Organization; 1997. Available: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41968>
26. Boelee E, Madsen H, International Water Management Institute. Irrigation and schistosomiasis in Africa: ecological aspects. Colombo, Sri Lanka: International Water Management Institute; 2006; 99: 34p.
27. Oomen JMV, Wolf J de, Jobin WR. Health and irrigation: Incomp. of disease-control measures in irrigation, a multi-faceted task in design, construction, operation. 1: Main subject chapters and three technical notes. Wageningen: Internat. Inst. for Land Reclamation and Improvement; 1990.
28. Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis.* 2006;6: 411–425. doi:10.1016/S1473-3099(06)70521-7
29. Kapito-Tembo AP, Mwapasa V, Meshnick SR, Samanyika Y, Banda D, Bowie C, et al. Prevalence Distribution and Risk Factors for *Schistosoma hematobium* Infection among School Children in Blantyre, Malawi. Bethony JM, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3: e361. doi:10.1371/journal.pntd.0000361

30. Kitron U, Mungai PL, Muchiri EM, King CH, Clennon JA. SPATIAL AND TEMPORAL VARIATIONS IN LOCAL TRANSMISSION OF SCHISTOSOMA HAEMATOBIIUM IN MSAMBWENI, KENYA. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75: 1034–1041. doi:10.4269/ajtmh.2006.75.1034
31. Mazigo HD, Nuwaha F, Kinung'hi SM, Morona D, de Moira AP, Wilson S, et al. Epidemiology and control of human schistosomiasis in Tanzania. *Parasit Vectors.* 2012;5: 274. doi:10.1186/1756-3305-5-274
32. Mccullough FS. The distribution of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* in East Africa. *Trop Geogr Med.* 1972;24: 199–207.
33. Malek EA. Freshwater Snails of Africa and Their Medical Importance. D. S. Brown. *Q Rev Biol.* 1981;56: 349–349. doi:10.1086/412386
34. Schrag SJ, Rollinson D. Effects of *Schistosoma haematobium* infection on reproductive success and male outcrossing ability in the simultaneous hermaphrodite, *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Planorbidae). *Parasitology.* 1994;108: 27–34. doi:10.1017/S0031182000078483
35. Kengne-Fokam AC, Nana-Djeunga HC, Djuikwo-Teukeng FF, Njiokou F. Analysis of mating system, fecundity, hatching and survival rates in two *Schistosoma mansoni* intermediate hosts (*Biomphalaria pfeifferi* and *Biomphalaria camerunensis*) in Cameroon. *Parasit Vectors.* 2016;9: 10. doi:10.1186/s13071-015-1285-4
36. Joubert PH, Pretorius SJ. The Effect of Constant Temperatures on the Hatching of Eggs and Survival of the Freshwater Snail *Biomphalaria Glabrata* (say). *J Limnol Soc South Afr.* 1985;11: 75–77. doi:10.1080/03779688.1985.9632833
37. Ross AG, McManus DP, Farrar J, Hunstman RJ, Gray DJ, Li Y-S. Neuroschistosomiasis. *J Neurol.* 2012;259: 22–32. doi:10.1007/s00415-011-6133-7
38. Burke ML, Jones MK, Gobert GN, Li YS, Ellis MK, McManus DP. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol.* 2009;31: 163–176. doi:10.1111/j.1365-3024.2009.01098.x
39. Barsoum RS, Esmat G, El-Baz T. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. *J Adv Res.* 2013;4: 433–444. doi:10.1016/j.jare.2013.01.005
40. King CH, Dangerfield-Cha M. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. *Chronic Illn.* 2008;4: 65–79. doi:10.1177/1742395307084407
41. Bustinduy AL, Thomas CL, Fiutem JJ, Parraga IM, Mungai PL, Muchiri EM, et al. Measuring Fitness of Kenyan Children with Polyparasitic Infections Using the 20-Meter Shuttle Run Test as a Morbidity Metric. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5: e1213. doi:10.1371/journal.pntd.0001213
42. Ndamba J, Makaza N, Munjoma M, Gomo E, Kaondera KC. The physical fitness and work performance of agricultural workers infected with *Schistosoma mansoni* in Zimbabwe. *Ann Trop Med Parasitol.* 1993;87: 553–561. doi:10.1080/00034983.1993.11812810
43. Jukes MCH, Nokes CA, Alcock KJ, Lambo JK, Kihamia C, Ngorosho N, et al. Heavy schistosomiasis associated with poor short-term memory and slower reaction times in Tanzanian schoolchildren. *Trop Med Int Health TM IH.* 2002;7: 104–117.
44. Garba A, Barkiré N, Djibo A, Lamine MS, Sofu B, Gouvras AN, et al. Schistosomiasis in infants and preschool-aged children: Infection in a single *Schistosoma haematobium* and a mixed *S.*

- haematobium-S. mansoni foci of Niger. *Acta Trop.* 2010;115: 212–219. doi:10.1016/j.actatropica.2010.03.005
45. Seto EYW, Sousa-Figueiredo JC, Betson M, Byalero C, Kabatereine NB, Stothard JR. Patterns of intestinal schistosomiasis among mothers and young children from Lake Albert, Uganda: water contact and social networks inferred from wearable global positioning system dataloggers. *Geospatial Health.* 2012;7: 1–13. doi:10.4081/gh.2012.99
 46. Coulibaly JT, N’Gbesso YK, Knopp S, N’Guessan NA, Silué KD, van Dam GJ, et al. Accuracy of Urine Circulating Cathodic Antigen Test for the Diagnosis of *Schistosoma mansoni* in Preschool-Aged Children before and after Treatment. Liang S, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7: e2109. doi:10.1371/journal.pntd.0002109
 47. Bosompem KM, Bentum IA, Otchere J, Anyan WK, Brown CA, Osada Y, et al. Infant schistosomiasis in Ghana: a survey in an irrigation community. *Trop Med Int Health TM IH.* 2004;9: 917–922. doi:10.1111/j.1365-3156.2004.01282.x
 48. Mitchell KM, Mutapi F, Savill NJ, Woolhouse MEJ. Explaining Observed Infection and Antibody Age-Profiles in Populations with Urogenital Schistosomiasis. *PLOS Comput Biol.* 2011;7: e1002237. doi:10.1371/journal.pcbi.1002237
 49. Dalton PR, Pole D. Water-contact patterns in relation to *Schistosoma haematobium* infection. *Bull World Health Organ.* 1978;56: 417–426.
 50. Wilkins HA, Goll PH, de C. Marshall TF, Moore PJ. Dynamics of *Schistosoma haematobium* infection in a Gambian community. III. Acquisition and loss of infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1984;78: 227–232. doi:10.1016/0035-9203(84)90283-9
 51. Colley DG, Secor WE. Immunology of human schistosomiasis. *Parasite Immunol.* 2014;36: 347–357. doi:10.1111/pim.12087
 52. Weerakoon KGAD, Gobert GN, Cai P, McManus DP. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28: 939–967. doi:10.1128/CMR.00137-14
 53. El-Khoby T, Galal N, Fenwick A, Barakat R, El-Hawey A, Nooman Z, et al. The epidemiology of schistosomiasis in Egypt: summary findings in nine governorates. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62: 88–99. doi:10.4269/ajtmh.2000.62.88
 54. Pinot de Moira A, Fulford AJC, Kabatereine NB, Kazibwe F, Ouma JH, Dunne DW, et al. Microgeographical and tribal variations in water contact and *Schistosoma mansoni* exposure within a Ugandan fishing community. *Trop Med Int Health TM IH.* 2007;12: 724–735. doi:10.1111/j.1365-3156.2007.01842.x
 55. Woolhouse ME. Patterns in parasite epidemiology: the peak shift. *Parasitol Today Pers Ed.* 1998;14: 428–434. doi:10.1016/s0169-4758(98)01318-0
 56. Mohamed AR, al Karawi M, Yasawy MI. Schistosomal colonic disease. *Gut.* 1990;31: 439–442. doi:10.1136/gut.31.4.439
 57. Cheever AW. A quantitative post-mortem study of *Schistosomiasis mansoni* in man. *Am J Trop Med Hyg.* 1968;17: 38–64. doi:10.4269/ajtmh.1968.17.38
 58. Strauss E. Hepatosplenic schistosomiasis: a model for the study of portal hypertension. *Ann Hepatol.* 2002;1: 6–11.

59. Richter J, Correia Dacal AR, Vergetti Siqueira JG, Poggensee G, Mannsmann U, Deelder A, et al. Sonographic prediction of variceal bleeding in patients with liver fibrosis due to *Schistosoma mansoni*. *Trop Med Int Health TM IH*. 1998;3: 728–735.
60. Gryseels B. Morbidity due to infection with *Schistosoma mansoni*: an update. *Trop Geogr Med*. 1992;44: 189–200.
61. Doehring-Schwerdtfeger E, Abdel-Rahim IM, Mohamed-Ali Q, Elsheikh M, Schlake J, Kardorff R, et al. Ultrasonographical Investigation of Periportal Fibrosis in Children with *Schistosoma mansoni* Infection: Evaluation of Morbidity. *Am J Trop Med Hyg*. 1990;42: 581–586. doi:10.4269/ajtmh.1990.42.581
62. King CH, Keating CE, Muruka JF, Ouma JH, Houser H, Siongok TK, et al. Urinary tract morbidity in schistosomiasis haematobia: associations with age and intensity of infection in an endemic area of Coast Province, Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 1988;39: 361–368. doi:10.4269/ajtmh.1988.39.361
63. Bundschuh M, Gerber A. Bilharziose. *Zentralblatt Für Arbeitsmedizin Arbeitsschutz Ergon*. 2014;64: 345–346. doi:10.1007/s40664-014-0059-8
64. Schwartz DA. Helminths in the induction of cancer II. *Schistosoma haematobium* and bladder cancer. *Trop Geogr Med*. 1981;33: 1–7.
65. Leutscher PDC, Høst E, Reimert CM. Semen quality in *Schistosoma haematobium* infected men in Madagascar. *Acta Trop*. 2009;109: 41–44. doi:10.1016/j.actatropica.2008.09.010
66. Ndeffo Mbah ML, Poolman EM, Drain PK, Coffee MP, van der Werf MJ, Galvani AP. HIV and *Schistosoma haematobium* prevalences correlate in sub-Saharan Africa. *Trop Med Int Health*. 2013;18: 1174–1179. doi:10.1111/tmi.12165
67. Mbabazi PS, Andan O, Fitzgerald DW, Chitsulo L, Engels D, Downs JA. Examining the relationship between urogenital schistosomiasis and HIV infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5: e1396. doi:10.1371/journal.pntd.0001396
68. Webbe G. A bilharzia and molluscan survey in the Handeni and Korogwe Districts of Tanganyika. *J Trop Med Hyg*. 1959;62: 37–42.
69. Jordan P. *Schistosoma haematobium* infection in a Sukuma village, Tanganyika. *Bull World Health Organ*. 1961;25: 695–699.
70. Webbe G. The transmission of *Schistosoma haematobium* in an area of Lake Province, Tanganyika. *Bull World Health Organ*. 1962;27: 59–85.
71. Rollinson D, Knopp S, Levitz S, Stothard JR, Tchuem Tchuente L-A, Garba A, et al. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. *Acta Trop*. 2013;128: 423–440. doi:10.1016/j.actatropica.2012.04.013
72. Kariuki HC, Clennon JA, Brady MS, Kitron U, Sturrock RF, Ouma JH, et al. Distribution patterns and cercarial shedding of *Bulinus nasutus* and other snails in the Msambweni area, Coast Province, Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;70: 449–456.
73. Clements ACA, Deville M-A, Ndayishimiye O, Brooker S, Fenwick A. Spatial co-distribution of neglected tropical diseases in the east African great lakes region: revisiting the justification for

- integrated control. *Trop Med Int Health TM IH*. 2010;15: 198–207. doi:10.1111/j.1365-3156.2009.02440.x
74. Sturrock RF. The influence of temperature on the biology of *Biomphalaria pfeifferi* (Krauss), an intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1966;60: 100–105.
 75. Kardorff R, Gabone RM, Mugashe C, Obiga D, Ramarokoto CE, Mahlert C, et al. *Schistosoma mansoni*-related morbidity on Ukerewe Island, Tanzania: clinical, ultrasonographical and biochemical parameters. *Trop Med Int Health TM IH*. 1997;2: 230–239.
 76. Siza JE, Kaatano GM, Chai J-Y, Eom KS, Rim H-J, Yong T-S, et al. Prevalence of Schistosomes and Soil-Transmitted Helminths and Morbidity Associated with Schistosomiasis among Adult Population in Lake Victoria Basin, Tanzania. *Korean J Parasitol*. 2015;53: 525–533. doi:10.3347/kjp.2015.53.5.525
 77. Olsen A, Kinung'hi S, Magnussen P. *Schistosoma mansoni* Infection along the Coast of Lake Victoria in Mwanza Region, Tanzania. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;92: 1240–1244. doi:10.4269/ajtmh.14-0676
 78. Brooker S, Clements ACA. Spatial heterogeneity of parasite co-infection: Determinants and geostatistical prediction at regional scales. *Int J Parasitol*. 2009;39: 591–597. doi:10.1016/j.ijpara.2008.10.014
 79. Taman A, El-Beshbishi S. Laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni: Current status and future trends. *Asian Pac J Trop Med*. 2019;12: 243. doi:10.4103/1995-7645.261270
 80. Sturrock RF. Schistosomiasis epidemiology and control: how did we get here and where should we go? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96: 17–27. doi:10.1590/S0074-02762001000900003
 81. Colley DG, Andros TS, Campbell CH. Schistosomiasis is more prevalent than previously thought: what does it mean for public health goals, policies, strategies, guidelines and intervention programs? *Infect Dis Poverty*. 2017;6: 63. doi:10.1186/s40249-017-0275-5
 82. Turner HC, Bettis AA, Dunn JC, Whitton JM, Hollingsworth TD, Fleming FM, et al. Economic Considerations for Moving beyond the Kato-Katz Technique for Diagnosing Intestinal Parasites As We Move Towards Elimination. *Trends Parasitol*. 2017;33: 435. doi:10.1016/j.pt.2017.01.007
 83. WHO | Basic laboratory methods in medical parasitology (archived). In: WHO [Internet]. [cited 28 Aug 2017]. Available: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9241544104_part1/en/
 84. WHO | Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: WHO Technical Report Series N° 912. In: WHO [Internet]. [cited 28 Aug 2017]. Available: http://www.who.int/intestinal_worms/resources/who_trs_912/en/
 85. De Vlas SJ, Engels D, Rabello AL, Oostburg BF, Van Lieshout L, Polderman AM, et al. Validation of a chart to estimate true *Schistosoma mansoni* prevalences from simple egg counts. *Parasitology*. 1997;114 (Pt 2): 113–121. doi:10.1017/s0031182096008207
 86. Secor WE. Early lessons from schistosomiasis mass drug administration programs. *F1000Research*. 2015; 4: F1000 Faculty Rev-1157. doi:10.12688/f1000research.6826.1

87. Lodh N, Mwansa JCL, Mutengo MM, Shiff CJ. Diagnosis of *Schistosoma mansoni* without the stool: comparison of three diagnostic tests to detect *Schistosoma* [corrected] *mansoni* infection from filtered urine in Zambia. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;89: 46–50. doi:10.4269/ajtmh.13-0104
88. Gray DJ, Ross AG, Li Y-S, McManus DP. Diagnosis and management of schistosomiasis. *BMJ.* 2011;342: d2651–d2651. doi:10.1136/bmj.d2651
89. Utzinger J, Booth M, N’goran EK, Müller I, Tanner M, Lengeler C. Relative contribution of day-to-day and intra-specimen variation in faecal egg counts of *Schistosoma mansoni* before and after treatment with praziquantel. *Parasitology.* 2001;122: 537–544. doi:10.1017/S0031182001007752
90. Stothard JR, Stanton MC, Bustinduy AL, Sousa-Figueiredo JC, VAN Dam GJ, Betson M, et al. Diagnostics for schistosomiasis in Africa and Arabia: a review of present options in control and future needs for elimination. *Parasitology.* 2014; 1–15. doi:10.1017/S0031182014001152
91. Cringoli G, Rinaldi L, Maurelli MP, Utzinger J. FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nat Protoc.* 2010;5: 503–515. doi:10.1038/nprot.2009.235
92. Eberl M, al-Sherbiny M, Hagan P, Ljubojevic S, Thomas AW, Wilson RA. A novel and sensitive method to monitor helminth infections by faecal sampling. *Acta Trop.* 2002;83: 183–187. doi:10.1016/S0001-706X(02)00089-X
93. Gyorkos TW, Ramsan M, Foum A, Khamis IS. Efficacy of New Low-Cost Filtration Device for Recovering *Schistosoma haematobium* Eggs from Urine. *J Clin Microbiol.* 2001;39: 2681–2682. doi:10.1128/JCM.39.7.2681-2682.2001
94. Yameny A. Evaluation of Nuclepore Membrane Filtration Technique for Diagnosis of *Schistosoma haematobium* Infection. *JBAAR.* 2015;1: 335–341.
95. Costain AH, MacDonald AS, Smits HH. Schistosome Egg Migration: Mechanisms, Pathogenesis and Host Immune Responses. *Front Immunol.* 2018;9: 3042. doi:10.3389/fimmu.2018.03042
96. Coltart CEM, Chew A, Storrar N, Armstrong M, Suff N, Morris L, et al. Schistosomiasis presenting in travellers: a 15 year observational study at the Hospital for Tropical Diseases, London. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2015;109: 214–220. doi:10.1093/trstmh/tru195
97. Tsang VC, Wilkins PP. Immunodiagnosis of schistosomiasis. *Immunol Invest.* 1997;26: 175–188.
98. Wilson RA. The Problem with Diagnosis of Intestinal Schistosomiasis. *EBioMedicine.* 2017;25: 16–17. doi:10.1016/j.ebiom.2017.10.004
99. Enk MJ, Silva GO e, Rodrigues NB. Diagnostic Accuracy and Applicability of a PCR System for the Detection of *Schistosoma mansoni* DNA in Human Urine Samples from an Endemic Area. *PLOS ONE.* 2012;7: e38947. doi:10.1371/journal.pone.0038947
100. Doenhoff MJ, Chiodini PL, Hamilton JV. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? *Trends Parasitol.* 2004;20: 35–39. doi:10.1016/j.pt.2003.10.019

101. Cai Y-C, Xu J-F, Steinmann P, Chen S-H, Chu Y-H, Tian L-G, et al. Field comparison of circulating antibody assays versus circulating antigen assays for the detection of schistosomiasis japonica in endemic areas of China. *Parasit Vectors*. 2014;7: 138. doi:10.1186/1756-3305-7-138
102. de Oliveira EJ, Kanamura HY, Takei K, Hirata RDC, Valli LCP, Nguyen NY, et al. Synthetic peptides as an antigenic base in an ELISA for laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102: 360–366. doi:10.1016/j.trstmh.2007.11.008
103. Standley C, Lwambo N, Lange C, Kariuki H, Adriko M, Stothard J. Performance of circulating cathodic antigen (CCA) urine-dipsticks for rapid detection of intestinal schistosomiasis in schoolchildren from shoreline communities of Lake Victoria. *Parasit Vectors*. 2010;3: 7. doi:10.1186/1756-3305-3-7
104. Stothard JR, Kabatereine NB, Tukahebwa EM, Kazibwe F, Rollinson D, Mathieson W, et al. Use of circulating cathodic antigen (CCA) dipsticks for detection of intestinal and urinary schistosomiasis. *Acta Trop*. 2006;97: 219–228. doi:10.1016/j.actatropica.2005.11.004
105. Rapid Medical Diagnostics. For qualitative detection of: Bilharzia (Schistosomiasis). Available: http://www.rapid-diagnostics.com/downloads/RMD%20Pamphlet%202011_06_13%20.pdf
106. Tchuenté L-AT, Fouodo CJK, Ngassam RIK, Sumo L, Noumedem CD, Kenfack CM, et al. Evaluation of Circulating Cathodic Antigen (CCA) Urine-Tests for Diagnosis of Schistosoma mansoni Infection in Cameroon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6: e1758. doi:10.1371/journal.pntd.0001758
107. Legesse M, Erko B. Field-based evaluation of a reagent strip test for diagnosis of Schistosomiasis mansoni by detecting circulating cathodic antigen (CCA) in urine in low endemic area in Ethiopia. *Parasite*. 2008;15: 151–155. doi:10.1051/parasite/2008152151
108. CORSTJENS PLAM, DE DOOD CJ, KORNELIS D, FAT EMTK, WILSON RA, KARIUKI TM, et al. Tools for diagnosis, monitoring and screening of Schistosoma infections utilizing lateral-flow based assays and upconverting phosphor labels. *Parasitology*. 2014;141: 1841–1855. doi:10.1017/S0031182014000626
109. van Grootveld R, van Dam GJ, de Dood C, de Vries JJC, Visser LG, Corstjens PLAM, et al. Improved diagnosis of active Schistosoma infection in travellers and migrants using the ultra-sensitive in-house lateral flow test for detection of circulating anodic antigen (CAA) in serum. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37: 1709–1716. doi:10.1007/s10096-018-3303-x
110. Corstjens PL, Nyakundi RK, de Dood CJ, Kariuki TM, Ochola EA, Karanja DM, et al. Improved sensitivity of the urine CAA lateral-flow assay for diagnosing active Schistosoma infections by using larger sample volumes. *Parasit Vectors*. 2015;8: 241. doi:10.1186/s13071-015-0857-7
111. Sousa MS, van Dam GJ, Pinheiro MCC, de Dood CJ, Peralta JM, Peralta RHS, et al. Performance of an Ultra-Sensitive Assay Targeting the Circulating Anodic Antigen (CAA) for Detection of Schistosoma mansoni Infection in a Low Endemic Area in Brazil. *Front Immunol*. 2019;10: 6820. doi:10.3389/fimmu.2019.00682
112. King CH, Bertsch D. Meta-analysis of Urine Heme Dipstick Diagnosis of Schistosoma haematobium Infection, Including Low-Prevalence and Previously-Treated Populations. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(9):e2431. doi:10.1371/journal.pntd.0002431
113. Feldmeier H, Poggensee G, Krantz I. A synoptic inventory of needs for research on women and tropical parasitic diseases. II. Gender-related biases in the diagnosis and morbidity assessment

- of schistosomiasis in women. *Acta Trop.* 1993;55: 139–169. doi:10.1016/0001-706x(93)90074-I
114. Hall A, Fentiman A. Blood in the urine of adolescent girls in an area of Ghana with a low prevalence of infection with *Schistosoma haematobium*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93: 411–412. doi:10.1016/s0035-9203(99)90138-4
 115. Feldmeier H, Poggensee G. Diagnostic techniques in schistosomiasis control. A review. *Acta Trop.* 1993;52: 205–220. doi:10.1016/0001-706X(93)90009-Z
 116. Hatz CFR. The use of ultrasound in schistosomiasis. *Advances in Parasitology.* Academic Press; 2001. pp. 225–284. doi:10.1016/S0065-308X(01)48007-9
 117. Abdel-Wahab MF, Esmat G, Farrag A, El-Boraey YA, Strickland GT. Grading of Hepatic Schistosomiasis by the Use of Ultrasonography. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;46: 403–408. doi:10.4269/ajtmh.1992.46.403
 118. Bergallo M, Costa C, Gribaudo G, Tarallo S, Baro S, Ponzi AN, et al. Evaluation of six methods for extraction and purification of viral DNA from urine and serum samples. *The new microbiologica.* 2006; 29. 111-9.
 119. Weerakoon KG, Gordon CA, McManus DP. DNA Diagnostics for Schistosomiasis Control. *Trop Med Infect Dis.* 2018;3: 81. doi:10.3390/tropicalmed3030081
 120. Gobert GN, Chai M, Duke M, McManus DP. Copro-PCR based detection of *Schistosoma* eggs using mitochondrial DNA markers. *Mol Cell Probes.* 2005;19: 250–254. doi:10.1016/j.mcp.2005.01.006
 121. Cnops L, Soentjens P, Clerinx J, Esbroeck MV. A *Schistosoma haematobium* -Specific Real-Time PCR for Diagnosis of Urogenital Schistosomiasis in Serum Samples of International Travelers and Migrants. *PLOS Negl Trop Dis.* 2013;7: e2413. doi:10.1371/journal.pntd.0002413
 122. Espírito-Santo MCC, Alvarado-Mora MV, Pinto PLS, de Brito T, Botelho-Lima L, Heath AR, et al. Detection of *Schistosoma mansoni* infection by TaqMan® Real-Time PCR in a hamster model. *Exp Parasitol.* 2014;143: 83–89. doi:10.1016/j.exppara.2014.05.013
 123. Oliveira LMA, Santos HLC, Gonçalves MML, Barreto MGM, Peralta JM. Evaluation of polymerase chain reaction as an additional tool for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;68: 416–421. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.07.016
 124. Pillay P, Taylor M, Zulu SG, Gundersen SG, Verweij JJ, Hoekstra P, et al. Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detection of *Schistosoma* DNA in Small-Volume Urine Samples Reflects Focal Distribution of Urogenital Schistosomiasis in Primary School Girls in KwaZulu Natal, South Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90: 546–552. doi:10.4269/ajtmh.13-0406
 125. Lodh N, Naples JM, Bosompem KM, Quartey J, Shiff CJ. Detection of Parasite-Specific DNA in Urine Sediment Obtained by Filtration Differentiates between Single and Mixed Infections of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* from Endemic Areas in Ghana. *PLOS ONE.* 2014;9: e91144. doi:10.1371/journal.pone.0091144
 126. Wichmann D, Panning M, Quack T, Kramme S, Burchard G-D, Grevelding C, et al. Diagnosing Schistosomiasis by Detection of Cell-Free Parasite DNA in Human Plasma. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(4):e422. doi:10.1371/journal.pntd.0000422

127. Fernández-Soto P, Gandasegui J, Rodríguez CC, Pérez-Arellano JL, Crego-Vicente B, Diego JG-B, et al. Detection of *Schistosoma mansoni*-derived DNA in human urine samples by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *PLOS ONE*. 2019;14: e0214125. doi:10.1371/journal.pone.0214125
128. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000;28: e63. doi:10.1093/nar/28.12.e63
129. Hove RJ ten, Verweij JJ, Vereecken K, Polman K, Dieye L, Lieshout L van. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102: 179–185. doi:10.1016/j.trstmh.2007.10.011
130. Bergquist R, Johansen MV, Utzinger J. Diagnostic dilemmas in helminthology: what tools to use and when? *Trends Parasitol*. 2009;25: 151–156. doi:10.1016/j.pt.2009.01.004
131. Allan F, Dunn AM, Emery AM, Stothard JR, Johnston DA, Kane RA, et al. Use of sentinel snails for the detection of *Schistosoma haematobium* transmission on Zanzibar and observations on transmission patterns. *Acta Trop*. 2013;128: 234–240. doi:10.1016/j.actatropica.2013.01.003
132. Wolmarans CT, de Kock KN, Strauss HD, Bornman M. Daily emergence of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* cercariae from naturally infected snails under field conditions. *J Helminthol*. 2002;76: 273–277. doi:10.1079/JOH2002122
133. Hamburger J, Hoffman O, Kariuki HC, Muchiri EM, Ouma JH, Koech DK, et al. Large-Scale, Polymerase Chain Reaction–Based Surveillance of *Schistosoma Haematobium* Dna in Snails from Transmission Sites in Coastal Kenya: A New Tool for Studying the Dynamics of Snail Infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71: 765–773.
134. Abbasi I, King CH, Muchiri EM, Hamburger J. Detection of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* DNA by Loop-Mediated Isothermal Amplification: Identification of Infected Snails from Early Prepatency. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83: 427–432. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0764
135. Elbaz T, Esmat G. Hepatic and Intestinal Schistosomiasis: Review. *J Adv Res*. 2013;4: 445–452. doi:10.1016/j.jare.2012.12.001
136. Cioli D, Basso A, Valle C, Pica-Mattocchia L. Decades down the line: the viability of praziquantel for future schistosomiasis treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10: 835–837. doi:10.1586/eri.12.70
137. El Ridi RAF, Tallima HA-M. Novel therapeutic and prevention approaches for schistosomiasis: review. *J Adv Res*. 2013;4: 467–478. doi:10.1016/j.jare.2012.05.002
138. Fenwick A, Savioli L, Engels D, Robert Bergquist N, Todd MH. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. *Trends Parasitol*. 2003;19: 509–515.
139. Utzinger J, Keiser J. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: common drugs for treatment and control. *Expert Opin Pharmacother*. 2004;5: 263–285. doi:10.1517/14656566.5.2.263

140. Montresor A, Odermatt P, Muth S, Iwata F, Raja'a YA, Assis AM, et al. The WHO dose pole for the administration of praziquantel is also accurate in non-African populations. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005;99: 78–81. doi:10.1016/j.trstmh.2004.06.006
141. Sousa-Figueiredo JC, Betson M, Atuhaire A, Arinaitwe M, Navaratnam AMD, Kabatereine NB, et al. Performance and safety of praziquantel for treatment of intestinal schistosomiasis in infants and preschool children. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6: e1864. doi:10.1371/journal.pntd.0001864
142. The pediatric formulation | Pediatric Praziquantel Consortium. [cited 4 Mar 2020]. Available: <https://www.pediatricpraziquantelconsortium.org/node/36>
143. Pica-Mattoccia L, Cioli D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. *Int J Parasitol.* 2004;34: 527–533. doi:10.1016/j.ijpara.2003.12.003
144. Xiao SH, Catto BA, Webster LT. Effects of praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo. *J Infect Dis.* 1985;151: 1130–1137. doi:10.1093/infdis/151.6.1130
145. Pavlin BI, Kozarsky P, Cetron MS. Acute pulmonary schistosomiasis in travelers: Case report and review of the literature. *Travel Med Infect Dis.* 2012;10: 209–219. doi:10.1016/j.tmaid.2012.06.001
146. Pérez del Villar L, Burguillo FJ, López-Abán J, Muro A. Systematic review and meta-analysis of artemisinin based therapies for the treatment and prevention of schistosomiasis. *PloS One.* 2012;7: e45867. doi:10.1371/journal.pone.0045867
147. Utzinger JK and J. Antimalarials in the Treatment of Schistosomiasis. *Current Pharmaceutical Design.* 2012; 18 (24): pp. 3531-3538(8). doi.org/10.2174/138161212801327293
148. Utzinger J, N'Goran EK, N'Dri A, Lengeler C, Xiao S, Tanner M. Oral artemether for prevention of *Schistosoma mansoni* infection: randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl.* 2000;355: 1320–1325. doi:10.1016/s0140-6736(00)02114-0
149. Doenhoff MJ, Kusel JR, Coles GC, Cioli D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96: 465–469. doi:10.1016/S0035-9203(02)90405-0
150. Savioli L, Hatz C, Dixon H, Kisumku UM, Mott KE. Control of morbidity due to *Schistosoma haematobium* on Pemba Island: egg excretion and hematuria as indicators of infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1990;43: 289–295. doi:10.4269/ajtmh.1990.43.289
151. Bockarie MJ, Kelly-Hope LA, Rebollo M, Molyneux DH. Preventive chemotherapy as a strategy for elimination of neglected tropical parasitic diseases: endgame challenges. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2013;368: 20120144. doi:10.1098/rstb.2012.0144
152. Bergquist R, Zhou X-N, Rollinson D, Reinhard-Rupp J, Klohe K. Elimination of schistosomiasis: the tools required. *Infect Dis Poverty.* 2017;6: 65. doi:10.1186/s40249-017-0370-7
153. Hotez PJ. Mass drug administration and integrated control for the world's high-prevalence neglected tropical diseases. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;85: 659–664. doi:10.1038/clpt.2009.16

154. Evan Secor W. Water-based interventions for schistosomiasis control. *Pathog Glob Health*. 2014;108: 246–254. doi:10.1179/2047773214Y.0000000149
155. King CH, Sutherland LJ, Bertsch D. Systematic Review and Meta-analysis of the Impact of Chemical-Based Mollusciciding for Control of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* Transmission. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(12): e0004290. doi:10.1371/journal.pntd.0004290
156. Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis*. 2008;21: 659–667. doi:10.1097/QCO.0b013e328318978f
157. Ross AGP, Chau TN, Inobaya MT, Olveda RM, Li Y, Harn DA. A new global strategy for the elimination of schistosomiasis. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. 2017;54: 130–137. doi:10.1016/j.ijid.2016.09.023
158. WHO | Weekly Epidemiological Record, 13 December 2019, vol. 94, 50 (pp. 601–612). In: WHO [Internet]. [cited 4 Mar 2020]. Available: <http://www.who.int/wer/2019/wer9450/en/>
159. Olveda DU, McManus DP, Ross AGP. Mass drug administration and the global control of schistosomiasis: successes, limitations and clinical outcomes. *Curr Opin Infect Dis*. 2016;29: 595. doi:10.1097/QCO.0000000000000312
160. Ross AGP, Olveda RM, Li Y. An audacious goal: the elimination of schistosomiasis in our lifetime through mass drug administration. *The Lancet*. 2015;385: 2220–2221. doi:10.1016/S0140-6736(14)61417-3
161. Dai J-R, Wang W, Liang Y-S, Li H-J, Guan X-H, Zhu Y-C. A novel molluscicidal formulation of niclosamide. *Parasitol Res*. 2008;103: 405–412. doi:10.1007/s00436-008-0988-2
162. Yang F, Long E, Wen J, Cao L, Zhu C, Hu H, et al. Linalool, derived from *Cinnamomum camphora* (L.) Presl leaf extracts, possesses molluscicidal activity against *Oncomelania hupensis* and inhibits infection of *Schistosoma japonicum*. *Parasit Vectors*. 2014;7: 407. doi:10.1186/1756-3305-7-407
163. Rawani A, Ghosh A, Chandra G. Laboratory evaluation of molluscicidal & mosquito larvicidal activities of leaves of *Solanum nigrum* L. *Indian J Med Res*. 2014;140: 285–295.
164. He P, Song L, Xie H, Liang J, Yuan D, Wu Z, et al. Nucleic acid detection in the diagnosis and prevention of schistosomiasis. *Infect Dis Poverty*. 2016;5: 25. doi:10.1186/s40249-016-0116-y
165. Shiff C. Accurate diagnostics for schistosomiasis: a new role for PCR? *Reports in Parasitology*. 2015;4:23-29 <https://doi.org/10.2147/RIP.S7431923>. 10.2147/RIP.S74319.
166. Meninger T, Lerman G, Regev-Rudzki N, Gold D, Ben-Dov I, Sidi Y, et al. Schistosomal miRNAs isolated from Extracellular Vesicles in sera of infected patients; a new tool for diagnosis and follow-up of human schistosomiasis. *J Infect Dis*. 2016; 215(3):378-386. doi:10.1093/infdis/jiw539
167. Elsherif Y, Tharwa E-S, Badra G, Sharaf S, Salama M, Waked I, et al. Proteomic Patterns in Serum and Urine of Patients Infected with *Schistosoma mansoni*: Basis for New Biomarker. *J Bacteriol Parasitol*. 2016; 1–4. doi:10.4172/2155-9597.1000291

168. Abdel-Hafeez EH, Mohamed RM, Belal US, Abdel-Raheem EM, Naoi K, Norose K. Polymerase Chain Reaction: A Better Method for Diagnosing Chronic *Schistosoma mansoni* Infections. *Trop Med Health*. 2015;43: 205–209. doi:10.2149/tmh.2015-22
169. Gomes LI, Enk MJ, Rabello A, Gomes LI, Enk MJ, Rabello A. Diagnosing schistosomiasis: where are we? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47: 3–11. doi:10.1590/0037-8682-0231-2013
170. Utzinger J, Tanner M. Microhabitat preferences of *Biomphalaria pfeifferi* and *Lymnaea natalensis* in a natural and a man-made habitat in Southeastern Tanzania. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95: 287–294. doi:10.1590/S0074-02762000000300002
171. National Bureau of Statistics Ministry of Finance Dar es Salaam, Office of Chief Government Statistician Ministry of State, President's Office, State House and Good Governance Zanzibar, editors. Basic Demographic and Socio-Economic Profile. 2014. Available: http://tanzania.countrystat.org/fileadmin/user_upload/countrystat_fenix/congo/docs/2012%20Tanzania%20Population%20and%20Housing%20Census-Basic%20Demographic%20and%20Socio-Economic%20Profile.pdf
172. National Bureau of Statistics Ministry of Finance Dar es Salaam, Office of Chief Government Statistician President's Office, Finance, Economy and Development Planning Zanzibar. 2012_Census_General_Report.pdf. 2013. Available: http://www.tzdpd.or.tz/fileadmin/documents/dpg_internal/dpg_working_groups_clusters/cluster_2/water/WSDP/Background_information/2012_Census_General_Report.pdf
173. Clements ACA, Lwambo NJS, Blair L, Nyandindi U, Kaatano G, Kinung'hi S, et al. Bayesian spatial analysis and disease mapping: tools to enhance planning and implementation of a schistosomiasis control programme in Tanzania: **Bayesian spatial analysis of schistosomiasis in disease control**. *Trop Med Int Health*. 2006;11: 490–503. doi:10.1111/j.1365-3156.2006.01594.x
174. Mazigo HD, Dunne DW, Wilson S, Kinung'hi SM, de Moira AP, Jones FM, et al. Co-infection with *Schistosoma mansoni* and Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) among residents of fishing villages of north-western Tanzania. *Parasit Vectors*. 2014; 7: 587. doi:10.1186/s13071-014-0587-2
175. Mazigo HD, Dunne DW, Morona D, Lutufyo TE, Kinung'hi SM, Kaatano G, et al. Periportal fibrosis, liver and spleen sizes among *S. mansoni* mono or co-infected individuals with human immunodeficiency virus-1 in fishing villages along Lake Victoria shores, North-Western, Tanzania. *Parasit Vectors*. 2015; 8:260. doi:10.1186/s13071-015-0876-4
176. Malenganisho WLM, Magnussen P, Friis H, Siza J, Kaatano G, Temu M, et al. *Schistosoma mansoni* morbidity among adults in two villages along Lake Victoria shores in Mwanza District, Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102: 532–541. doi:10.1016/j.trstmh.2008.03.006
177. Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1972;14: 397–400.
178. Robinson E, Picon D, Sturrock HJ, Sabasio A, Lado M, Kolaczinski J, et al. The performance of haematuria reagent strips for the rapid mapping of urinary schistosomiasis: field experience from Southern Sudan. *Trop Med Int Health*. 2009;14: 1484–1487. doi:10.1111/j.1365-3156.2009.02407.x
179. French MD, Rollinson D, Basáñez M-G, Mgeni AF, Khamis IS, Stothard JR. School-based control of urinary schistosomiasis on Zanzibar, Tanzania: Monitoring micro-haematuria with reagent

- strips as a rapid urological assessment. *J Pediatr Urol.* 2007;3: 364–368.
doi:10.1016/j.jpuro.2007.01.198
180. Mafe M. A., Stamm T., Utzinger J., N’goran E. K. Control of urinary schistosomiasis: an investigation into the effective use of questionnaires to identify high-risk communities and individuals in Niger State, Nigeria. *Trop Med Int Health.* 2001;5: 53–63. doi:10.1046/j.1365-3156.2000.00508.x
 181. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1: 263–273. doi:10.1101/sqb.1986.051.01.032
 182. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnol Nat Publ Co.* 1993;11: 1026–1030. doi:10.1038/nbt0993-1026
 183. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. 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.* 1991;88: 7276–7280.
 184. Hamburger J, Turetski T, Kapeller I, Deresiewicz R. Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species-specific probe. *Mol Biochem Parasitol.* 1991;44: 73–80. doi:10.1016/0166-6851(91)90222-R
 185. Pontes LA, Dias-Neto E, Rabello A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66: 157–162.
 186. Fuss A, Mazigo HD, Mueller A. Malacological survey to identify transmission sites for intestinal schistosomiasis on Ijinga Island, Mwanza, north-western Tanzania. *Acta Trop.* 2019; 203:105289. doi:10.1016/j.actatropica.2019.105289
 187. National AIDS Control Programme (NaCP). National Guidelines For the Management of HIV and AIDS. Government of Tanzania.; 2009. Available: https://www.who.int/hiv/pub/guidelines/tanzania_art.pdf
 188. Mandahl-Barth G. Key to the identification of East and Central African freshwater snails of medical and veterinary importance. *Bull World Health Organ.* 1962;27: 135–150.
 189. Abath FG, Gomes AL do V, Melo FL, Barbosa CS, Werkhauser RP. Molecular approaches for the detection of *Schistosoma mansoni*: possible applications in the detection of snail infection, monitoring of transmission sites, and diagnosis of human infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101: 145–148. doi:10.1590/S0074-02762006000900023
 190. King CH, Sturrock RF, Kariuki HC, Hamburger J. Transmission control for schistosomiasis – why it matters now. *Trends Parasitol.* 2006;22: 575–582. doi:10.1016/j.pt.2006.09.006
 191. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215: 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
 192. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25: 3389–3402. doi:10.1093/nar/25.17.3389

193. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol J Comput Mol Cell Biol.* 2000;7: 203–214. doi:10.1089/10665270050081478
194. Howe KL, Bolt BJ, Shafie M, Kersey P, Berriman M. WormBase ParaSite – a comprehensive resource for helminth genomics. *Mol Biochem Parasitol.* 2017;215: 2–10. doi:10.1016/j.molbiopara.2016.11.005
195. Howe KL, Bolt BJ, Cain S, Chan J, Chen WJ, Davis P, et al. WormBase 2016: expanding to enable helminth genomic research. *Nucleic Acids Res.* 2016;44: D774–D780. doi:10.1093/nar/gkv1217
196. Al-Shehri H, Koukounari A, Stanton MC, Adriko M, Arinaitwe M, Atuhaire A, et al. Surveillance of intestinal schistosomiasis during control: a comparison of four diagnostic tests across five Ugandan primary schools in the Lake Albert region. *Parasitology.* 2018; 1–8. doi:10.1017/S003118201800029X
197. Shane HL, Verani JR, Abudho B, Montgomery SP, Blackstock AJ, Mwinzi PNM, et al. Evaluation of Urine CCA Assays for Detection of *Schistosoma mansoni* Infection in Western Kenya. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5: e951. doi:10.1371/journal.pntd.0000951
198. Vinkeles Melchers NVS, van Dam GJ, Shaproski D, Kahama AI, Brienen EAT, Vennervald BJ, et al. Diagnostic Performance of *Schistosoma* Real-Time PCR in Urine Samples from Kenyan Children Infected with *Schistosoma haematobium*: Day-to-day Variation and Follow-up after Praziquantel Treatment. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8 (4):e2807. doi:10.1371/journal.pntd.0002807
199. Drew A. Linzer, Lewis Jeffrey. Polytomous Variable Latent Class Analysis." R package version 1.4. 2013. Available: <http://dlinzer.github.com/poLCA>
200. Linzer, Drew A, Jeffrey Lewis. poLCA: an R Package for Polytomous Variable Latent Class Analysis." *Journal of Statistical Software.* 2011; 42(10): 1-29. Available: <http://www.jstatsoft.org/v42/i10>
201. Fuss A, Mazigo HD, Tappe D, Kasang C, Mueller A. Comparison of sensitivity and specificity of three diagnostic tests to detect *Schistosoma mansoni* infections in school children in Mwanza region, Tanzania. *PLoS ONE.* 2018; 13(8): e0202499. doi:10.1371/journal.pone.0202499
202. Fuss A, Mazigo HD, Mueller A. Evaluation of serum-based real-time PCR to detect *Schistosoma mansoni* infection before and after treatment. *Infect Dis Poverty.* 2020;9: 74. doi:10.1186/s40249-020-00698-z
203. van Dam GJ, Xu J, Bergquist R, de Dood CJ, Utzinger J, Qin Z-Q, et al. An ultra-sensitive assay targeting the circulating anodic antigen for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* in a low-endemic area, People's Republic of China. *Acta Trop.* 2015;141: 190–197. doi:10.1016/j.actatropica.2014.08.004
204. Mueller A, Fuss A, Ziegler U, Kaatano GM, Mazigo HD. Intestinal schistosomiasis of Ijinga Island, north-western Tanzania: prevalence, intensity of infection, hepatosplenic morbidities and their associated factors. *BMC Infect Dis.* 2019;19: 832. doi:10.1186/s12879-019-4451-z
205. Standley CJ, Vounatsou P, Gosoni L, Jørgensen A, Adriko M, Lwambo NJS, et al. The distribution of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) in Lake Victoria with ecological and spatial predictions using Bayesian modelling. *ResearchGate.* 2012;683. doi:10.1007/s10750-011-0962-3

206. Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP, Cerqueira GC, et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*. 2009;460: 352–358. doi:10.1038/nature08160
207. Protasio AV, Tsai IJ, Babbage A, Nichol S, Hunt M, Aslett MA, et al. A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6: e1455–e1455. doi:10.1371/journal.pntd.0001455
208. Butler SE, Montgomery SP, Karanja DMS, Mwinzi PNM, Shane HL, Verani JR, et al. Schistosomiasis among Young Children in Usoma, Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84: 787–791. doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0685
209. Colley DG, Binder S, Campbell C, King CH, Tchuem Tchuente L-A, N’Goran EK, et al. A Five-Country Evaluation of a Point-of-Care Circulating Cathodic Antigen Urine Assay for the Prevalence of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88: 426–432. doi:10.4269/ajtmh.12-0639
210. Casacuberta M, Kinunghi S, Vennervald BJ, Olsen A. 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*. 2016;1: 105–115. doi:10.1016/j.parepi.2016.04.002
211. Kittur N, Castleman JD, Campbell CH, King CH, Colley DG. Comparison of *Schistosoma mansoni* Prevalence and Intensity of Infection, as Determined by the Circulating Cathodic Antigen Urine Assay or by the Kato-Katz Fecal Assay: A Systematic Review. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;94: 605–610. doi:10.4269/ajtmh.15-0725
212. Ferreira FT, Fidelis TA, Pereira TA, Otoni A, Queiroz LC, Amâncio FF, et al. Sensitivity and specificity of the circulating cathodic antigen rapid urine test in the diagnosis of *Schistosomiasis mansoni* infection and evaluation of morbidity in a low- endemic area in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017;50: 358–364. doi:10.1590/0037-8682-0423-2016
213. Sanneh B, Joof E, Sanyang AM, Renneker K, Camara Y, Sey AP, et al. Field evaluation of a schistosome circulating cathodic antigen rapid test kit at point-of-care for mapping of schistosomiasis endemic districts in The Gambia. *PLoS ONE*. 2017; 12(8):e0182003. doi:10.1371/journal.pone.0182003
214. Standley CJ, Adriko M, Arinaitwe M, Atuhaire A, Kazibwe F, Fenwick A, et al. Epidemiology and control of intestinal schistosomiasis on the Sesse Islands, Uganda: integrating malacology and parasitology to tailor local treatment recommendations. *Parasit Vectors*. 2010;3: 64. doi:10.1186/1756-3305-3-64
215. Adriko M, Standley CJ, Tinkitina B, Tukahebwa EM, Fenwick A, Fleming FM, et al. Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) urine-cassette assay as a survey tool for *Schistosoma mansoni* in different transmission settings within Bugiri District, Uganda. *Acta Trop*. 2014;136: 50–57. doi:10.1016/j.actatropica.2014.04.001
216. Erko B, Medhin G, Teklehaymanot T, Degarege A, Legesse M. Evaluation of urine-circulating cathodic antigen (Urine-CCA) cassette test for the detection of *Schistosoma mansoni* infection in areas of moderate prevalence in Ethiopia. *Trop Med Int Health*. 18: 1029–1035. doi:10.1111/tmi.12117
217. Cnops L, Tannich E, Polman K, Clerinx J, Van Esbroeck M. *Schistosoma* real-time PCR as diagnostic tool for international travellers and migrants: *Schistosoma* real-time PCR as

- diagnostic tool. *Trop Med Int Health*. 2012;17: 1208–1216. doi:10.1111/j.1365-3156.2012.03060.x
218. Espírito-Santo MCC, Alvarado-Mora MV, Dias-Neto E, Botelho-Lima LS, Moreira JP, Amorim M, et al. Evaluation of real-time PCR assay to detect *Schistosoma mansoni* infections in a low endemic setting. *BMC Infect Dis*. 2014;14: 558. doi:10.1186/s12879-014-0558-4
219. Allam AF, Kader O, Zaki A, Youssef Shehab A, Farag HF. Assessing the marginal error in diagnosis and cure of *Schistosoma mansoni* in areas of low endemicity using Percoll and PCR techniques. *Trop Med Int Health*. 2009;14: 316–321. doi:10.1111/j.1365-3156.2009.02225.x
220. Pontes LA, Oliveira MC, Katz N, Dias-Neto E, Rabello A. Comparison of a Polymerase Chain Reaction and the Kato-Katz Technique for Diagnosing Infection with *Schistosoma Mansoni*. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68: 652–656.
221. Okoyo C, Simiyu E, Njenga SM, Mwandawiro C. 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*. 2018;18 (1):478.. doi:10.1186/s12889-018-5414-9
222. Utzinger J, N’Goran EK, Caffrey CR, Keiser J. From innovation to application: Social–ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. *Acta Trop*. 2011;120, Supplement 1: S121–S137. doi:10.1016/j.actatropica.2010.08.020
223. Mwinzi PNM, Kittur N, Ochola E, Cooper PJ, Campbell CH, King CH, et al. Additional Evaluation of the Point-of-Contact Circulating Cathodic Antigen Assay for *Schistosoma mansoni* Infection. *Front Public Health*. 2015;3:48. doi:10.3389/fpubh.2015.00048
224. Kato-Hayashi N, Yasuda M, Yuasa J, Isaka S, Haruki K, Ohmae H, et al. Use of Cell-Free Circulating Schistosome DNA in Serum, Urine, Semen, and Saliva To Monitor a Case of Refractory Imported Schistosomiasis Hematobia. *J Clin Microbiol*. 2013;51: 3435–3438. doi:10.1128/JCM.01219-13
225. Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, Shelepov V, Alechina R, Molyaka Y, et al. Genetic Analysis of DNA Excreted in Urine: A New Approach for Detecting Specific Genomic DNA Sequences from Cells Dying in an Organism. *Clin Chem*. 2000;46: 1078–1084.
226. Su Y-H, Wang M, Brenner DE, Ng A, Melkonyan H, Umansky S, et al. Human Urine Contains Small, 150 to 250 Nucleotide-Sized, Soluble DNA Derived from the Circulation and May Be Useful in the Detection of Colorectal Cancer. *J Mol Diagn JMD*. 2004;6: 101–107.
227. Enk MJ, Oliveira e Silva G, Rodrigues NB. A salting out and resin procedure for extracting *Schistosoma mansoni* DNA from human urine samples. *BMC Res Notes*. 2010;3: 115. doi:10.1186/1756-0500-3-115
228. Weerakoon KG, Gordon CA, Williams GM, Cai P, Gobert GN, Olveda RM, et al. Droplet Digital PCR Diagnosis of Human Schistosomiasis: Parasite Cell-Free DNA Detection in Diverse Clinical Samples. *J Infect Dis*. 2017;216: 1611–1622. doi:10.1093/infdis/jix521
229. Wang W, Wang L, Liang Y-S. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. *Parasitol Res*. 2012;111: 1871–1877. doi:10.1007/s00436-012-3151-z

230. Lamberton PHL, Kabatereine NB, Oguttu DW, Fenwick A, Webster JP. Sensitivity and Specificity of Multiple Kato-Katz Thick Smears and a Circulating Cathodic Antigen Test for *Schistosoma mansoni* Diagnosis Pre- and Post-repeated-Praziquantel Treatment. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8: e3139. doi:10.1371/journal.pntd.0003139
231. Eraky MA, Aly NSM. Diagnostic and prognostic value of cell free circulating *Schistosoma mansoni* DNA: an experimental study. *J Parasit Dis Off Organ Indian Soc Parasitol*. 2016;40: 1014–1020. doi:10.1007/s12639-014-0626-0
232. Wichmann D, Poppert S, Von Thien H, Clerinx J, Dieckmann S, Jensenius M, et al. Prospective European-wide multicentre study on a blood based real-time PCR for the diagnosis of acute schistosomiasis. *BMC Infect Dis*. 2013;13: 55. doi:10.1186/1471-2334-13-55
233. Wang C, Chen L, Yin X, Hua W, Hou M, Ji M, et al. Application of DNA-based diagnostics in detection of schistosomal DNA in early infection and after drug treatment. *Parasit Vectors*. 2011;4: 164. doi:10.1186/1756-3305-4-164
234. Kumar A, Mhatre S, Godbole S, Jha P, Dikshit R. Optimization of extraction of genomic DNA from archived dried blood spot (DBS): potential application in epidemiological research & bio banking. *Gates Open Res*. 2019;2: 57. doi:10.12688/gatesopenres.12855.2
235. Choi E-H, Lee SK, Ihm C, Sohn Y-H. Rapid DNA Extraction from Dried Blood Spots on Filter Paper: Potential Applications in Biobanking. *Osong Public Health Res Perspect*. 2014;5: 351–357. doi:10.1016/j.phrp.2014.09.005
236. Strøm GEA, Tellevik MG, Hanevik K, Langeland N, Blomberg B. Comparison of four methods for extracting DNA from dried blood on filter paper for PCR targeting the mitochondrial *Plasmodium* genome. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2014;108: 488–494. doi:10.1093/trstmh/tru084
237. Färnert A, Arez AP, Correia AT, Björkman A, Snounou G, do Rosário V. Sampling and storage of blood and the detection of malaria parasites by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1999;93: 50–53. doi:10.1016/s0035-9203(99)90177-3
238. Chaorattanakawee S, Natalang O, Hananantachai H, Nacher M, Brockman A, Krudsood S, et al. Storage duration and polymerase chain reaction detection of *Plasmodium falciparum* from blood spots on filter paper. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;69: 42–44.
239. Ghantous A, Saffery R, Cros M-P, Ponsonby A-L, Hirschfeld S, Kasten C, et al. Optimized DNA extraction from neonatal dried blood spots: application in methylome profiling. *BMC Biotechnol*. 2014;14: 60. doi:10.1186/1472-6750-14-60
240. Kallestrup P, Zinyama R, Gomo E, Butterworth AE, van Dam GJ, Erikstrup C, et al. Schistosomiasis and HIV-1 Infection in Rural Zimbabwe: Implications of Coinfection for Excretion of Eggs. *J Infect Dis*. 2005;191: 1311–1320. doi:10.1086/428907
241. Karanja DM, Colley DG, Nahlen BL, Ouma JH, Secor WE. Studies on schistosomiasis in western Kenya: I. Evidence for immune-facilitated excretion of schistosome eggs from patients with *Schistosoma mansoni* and human immunodeficiency virus coinfections. *Am J Trop Med Hyg*. 1997;56: 515–521. doi:10.4269/ajtmh.1997.56.515
242. Fontanet AL, Woldemichael T, Sahlu T, van Dam GJ, Messele T, Rinke de Wit T, et al. Epidemiology of HIV and *Schistosoma mansoni* infections among sugar-estate residents in Ethiopia. *Ann Trop Med Parasitol*. 2000;94: 145–155.

243. Dunne DW, Hassounah O, Musallam R, Lucas S, Pepys MB, Baltz M, et al. Mechanisms of *Schistosoma mansoni* egg excretion: parasitological observations in immunosuppressed mice reconstituted with immune serum. *Parasite Immunol.* 1983;5: 47–60. doi:10.1111/j.1365-3024.1983.tb00722.x
244. Harrison RA, Doenhoff MJ. Retarded development of *Schistosoma mansoni* in immunosuppressed mice. *Parasitology.* 1983;86 (Pt 3): 429–438. doi:10.1017/s0031182000050629
245. Doenhoff MJ, Bain J. The immune-dependence of schistosomicidal chemotherapy: relative lack of efficacy of an antimonial in *Schistosoma mansoni*-infected mice deprived of their T-cells and the demonstration of drug-antiserum synergy. *Clin Exp Immunol.* 1978;33: 232–238.
246. Doenhoff MJ, Pearson S, Dunne DW, Bickle Q, Lucas S, Bain J, et al. Immunological control of hepatotoxicity and parasite egg excretion in *Schistosoma mansoni* infections: stage specificity of the reactivity of immune serum in T-cell deprived mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981;75: 41–53. doi:10.1016/0035-9203(81)90012-2
247. Doenhoff MJ, Hassounah O, Murare H, Bain J, Lucas S. The schistosome egg granuloma: immunopathology in the cause of host protection or parasite survival? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986;80: 503–514. doi:10.1016/0035-9203(86)90126-4
248. Mngara J, de Dood CJ, Hoekstra PT, Masikini PJ, Colombe S, Corstjens PLAM, et al. Decreased Sensitivity of *Schistosoma* sp. Egg Microscopy in Women and HIV-Infected Individuals. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;98: 1159–1164. doi:10.4269/ajtmh.17-0790
249. Mazigo HD, Heukelbach J. Diagnostic Performance of Kato Katz Technique and Point-of-Care Circulating Cathodic Antigen Rapid Test in Diagnosing *Schistosoma mansoni* Infection in HIV-1 Co-Infected Adults on the Shoreline of Lake Victoria, Tanzania. *Trop Med Infect Dis.* 2018;3: 54. doi:10.3390/tropicalmed3020054
250. Mugono M, Konje E, Kuhn S, Mpogoro FJ, Morona D, Mazigo HD. Intestinal schistosomiasis and geohelminths of Ukara Island, North-Western Tanzania: prevalence, intensity of infection and associated risk factors among school children. *Parasit Vectors.* 2014;7: 612. doi:10.1186/s13071-014-0612-5
251. Boisier P, Ramarokoto C-E, Ravoniarimbina P, Rabarijaona L, Ravaoalimalala VE. Geographic differences in hepatosplenic complications of schistosomiasis mansoni and explanatory factors of morbidity. *Trop Med Int Health.* 2001;6: 699–706. doi:10.1046/j.1365-3156.2001.00781.x
252. Ruganuzza DM, Mazigo HD, Waihenya R, Morona D, Mkoji GM. *Schistosoma mansoni* among pre-school children in Musozi village, Ukerewe Island, North-Western-Tanzania: prevalence and associated risk factors. *Parasit Vectors.* 2015;8: 377. doi:10.1186/s13071-015-0997-9
253. Nalugwa A, Nuwaha F, Tukahebwa EM, Olsen A. *Schistosoma mansoni*-Associated Morbidity among Preschool-Aged Children along the Shores of Lake Victoria in Uganda. *Trop Med Infect Dis.* 2017;2: 58. doi:10.3390/tropicalmed2040058
254. Osakunor DNM, Woolhouse MEJ, Mutapi F. Paediatric schistosomiasis: What we know and what we need to know. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12: e0006144. doi:10.1371/journal.pntd.0006144

255. Mazigo HD, Kepha S, Kinung'hi SM. 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*. 2018;76:29. doi:10.1186/s13690-018-0274-4
256. Montresor A, Garba A. Treatment of preschool children for schistosomiasis. *Lancet Glob Health*. 2017;5: e640–e641. doi:10.1016/S2214-109X(17)30202-4
257. Mduluzi T, Mutapi F. Putting the treatment of paediatric schistosomiasis into context. *Infect Dis Poverty*. 2017;6: 85. doi:10.1186/s40249-017-0300-8
258. Reinhard-Rupp J, Klohe K. Developing a comprehensive response for treatment of children under 6 years of age with schistosomiasis: research and development of a pediatric formulation of praziquantel. *Infect Dis Poverty*. 2017;6: 122. doi:10.1186/s40249-017-0336-9
259. Melo FL, Gomes AL do V, Barbosa CS, Werkhauser RP, Abath FGC. Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006;100: 1049–1055. doi:10.1016/j.trstmh.2005.12.008
260. Hamburger J, Abbasi I, Kariuki C, Wanjala A, Mzungu E, Mungai P, et al. Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification Suitable for Molecular Monitoring of Schistosome-Infected Snails in Field Laboratories. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88: 344–351. doi:10.4269/ajtmh.2012.12-0208
261. Bakuza JS, Gillespie R, Nkwengulila G, Adam A, Kilbride E, Mable BK. Assessing *S. mansoni* prevalence in *Biomphalaria* snails in the Gombe ecosystem of western Tanzania: the importance of DNA sequence data for clarifying species identification. *Parasit Vectors*. 2017;10 (1):584. doi:10.1186/s13071-017-2525-6
262. Norton A, Rollinson D, Richards L, Webster J. Simultaneous infection of *Schistosoma mansoni* and *S. rodhaini* in *Biomphalaria glabrata*: impact on chronobiology and cercarial behaviour. *Parasit Vectors*. 2008;1: 43. doi:10.1186/1756-3305-1-43
263. Steinauer ML, Mwangi IN, Maina GM, Kinuthia JM, Mutuku MW, Agola EL, et al. Interactions between Natural Populations of Human and Rodent Schistosomes in the Lake Victoria Region of Kenya: A Molecular Epidemiological Approach. Knight M, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2: e222. doi:10.1371/journal.pntd.0000222
264. Lu L, Zhang S-M, Mutuku MW, Mkoji GM, Loker ES. Relative compatibility of *Schistosoma mansoni* with *Biomphalaria sudanica* and *B. pfeifferi* from Kenya as assessed by PCR amplification of the *S. mansoni* ND5 gene in conjunction with traditional methods. *Parasit Vectors*. 2016;9: 166. doi:10.1186/s13071-016-1457-x
265. Ofulla AVO, Karanja D, Omondi R, Okurut T, Matano A, Jembe T, et al. Relative abundance of mosquitoes and snails associated with water hyacinth and hippo grass in the Nyanza gulf of Lake Victoria: Mosquitoes and snails macrophytes association in Nyanza gulf, Lake Victoria. *Lakes Reserv Res Manag*. 2010;15: 255–271. doi:10.1111/j.1440-1770.2010.00434.x
266. Standley CJ, Wade CM, Stothard JR. A Fresh Insight into Transmission of Schistosomiasis: A Misleading Tale of *Biomphalaria* in Lake Victoria. *PLOS ONE*. 2011;6: e26563. doi:10.1371/journal.pone.0026563
267. Rowel C, Fred B, Betson M, Sousa-Figueiredo JC, Kabatereine NB, Stothard JR, et al. Environmental Epidemiology of Intestinal Schistosomiasis in Uganda: Population Dynamics of

- Biomphalaria (Gastropoda: Planorbidae) in Lake Albert and Lake Victoria with Observations on Natural Infections with Digenetic Trematodes, Environmental Epidemiology of Intestinal Schistosomiasis in Uganda: Population Dynamics of Biomphalaria (Gastropoda: Planorbidae) in Lake Albert and Lake Victoria with Observations on Natural Infections with Digenetic Trematodes. *BioMed Res Int* 2015;2015, 2015: e717261. doi:10.1155/2015/717261, 10.1155/2015/717261
268. Opisa S, Odiere MR, Jura WG, Karanja DM, Mwinzi PN. Malacological survey and geographical distribution of vector snails for schistosomiasis within informal settlements of Kisumu City, western Kenya. *Parasit Vectors*. 2011;4: 226. doi:10.1186/1756-3305-4-226
269. Kazibwe F, Makanga B, Rubaire-Akiiki C, Ouma J, Kariuki C, Kabatereine NB, et al. Ecology of Biomphalaria (Gastropoda: Planorbidae) in Lake Albert, Western Uganda: snail distributions, infection with schistosomes and temporal associations with environmental dynamics. *Hydrobiologia*. 2006;568: 433–444. doi:10.1007/s10750-006-0224-y
270. Sabah AA, Fletcher C, Webbe G, Doenhoff MJ. Schistosoma mansoni: Chemotherapy of infections of different ages. *Exp Parasitol*. 1986;61: 294–303. doi:10.1016/0014-4894(86)90184-0
271. Valle C, Troiani AR, Festucci A, Pica-Mattocchia L, Liberti P, Wolstenholme A, et al. Sequence and level of endogenous expression of calcium channel beta subunits in Schistosoma mansoni displaying different susceptibilities to praziquantel. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;130: 111–115. doi:10.1016/s0166-6851(03)00171-3
272. Raso G, N’Goran EK, Toty A, Luginbühl A, Adjoua CA, Tian-Bi NT, et al. Efficacy and side effects of praziquantel against Schistosoma mansoni in a community of western Côte d’Ivoire. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004;98: 18–27. doi:10.1016/S0035-9203(03)00003-8
273. Garba A, Lamine MS, Barkiré N, Djibo A, Sofu B, Gouvras AN, et al. Efficacy and safety of two closely spaced doses of praziquantel against Schistosoma haematobium and S. mansoni and re-infection patterns in school-aged children in Niger. *Acta Trop*. 2013;128: 334–344. doi:10.1016/j.actatropica.2012.08.008
274. Daffalla AA, Fenwick A. Resurgence of Schistosoma mansoni and Schistosoma haematobium after the end of a 4-year control programme against S. mansoni. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1982;76: 701–702. doi:10.1016/0035-9203(82)90245-0
275. N’Goran EK, Utzinger J, N’Guessan AN, Müller I, Zamblé K, Lohourignon KL, et al. Reinfection with Schistosoma haematobium following school-based chemotherapy with praziquantel in four highly endemic villages in Côte d’Ivoire. *Trop Med Int Health*. 2001;6: 817–825. doi:10.1046/j.1365-3156.2001.00785.x
276. Munisi DZ, Buza J, Mpolya EA, Angelo T, Kinung’hi SM. The Efficacy of Single-Dose versus Double-Dose Praziquantel Treatments on Schistosoma mansoni Infections: Its Implication on Undernutrition and Anaemia among Primary Schoolchildren in Two On-Shore Communities, Northwestern Tanzania. In: *BioMed Research International* [Internet]. 2017 [cited 16 Dec 2019]. doi:https://doi.org/10.1155/2017/7035025
277. Wu W, Wang W, Huang Y-X. New insight into praziquantel against various developmental stages of schistosomes. *Parasitol Res*. 2011;109: 1501–1507. doi:10.1007/s00436-011-2670-3
278. Crellen T, Walker M, Lamberton PHL, Kabatereine NB, Tukahebwa EM, Cotton JA, et al. Reduced Efficacy of Praziquantel Against Schistosoma mansoni Is Associated With Multiple

- Rounds of Mass Drug Administration. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2016;63: 1151–1159. doi:10.1093/cid/ciw506
279. Le L, Hsieh MH. Diagnosing Urogenital Schistosomiasis: Dealing with Diminishing Returns. *Trends Parasitol.* 2017;33: 378–387. doi:10.1016/j.pt.2016.12.009
280. Bärenbold O, Raso G, Coulibaly JT, N’Goran EK, Utzinger J, Vounatsou P. Estimating sensitivity of the Kato-Katz technique for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* and hookworm in relation to infection intensity. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11: e0005953. doi:10.1371/journal.pntd.0005953
281. Hertel J, Kedves K, Hassan AHM, Haberl B, Haas W. Detection of *Schistosoma mansoni* cercariae in plankton samples by PCR. *Acta Trop.* 2004;91: 43–46. doi:10.1016/j.actatropica.2004.01.002
282. Vale N, Gouveia MJ, Rinaldi G, Brindley PJ, Gärtner F, Costa JMC da. Praziquantel for Schistosomiasis: Single-Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61. doi:10.1128/AAC.02582-16

9. Publikationen & Kongressbeiträge

Aus dieser Arbeit sind folgende Publikationen und Kongressbeiträge hervorgegangen:

9.1 Publikationen

Fuss A, Mazigo HD, Tappe D, Kasang C, Mueller A. Comparison of sensitivity and specificity of three diagnostic tests to detect *Schistosoma mansoni* infections in school children in Mwanza region, Tanzania. PLoS ONE. 22. August 2018;13(8).

Mueller A, **Fuss A**, Ziegler U, Kaatano GM, Mazigo HD. Intestinal schistosomiasis of Ijinga Island, north-western Tanzania: prevalence, intensity of infection, hepatosplenic morbidities and their associated factors. BMC Infect Dis. 7. Oktober 2019;19(1):832.

Fuss A, Mazigo HD, Mueller A. Malacological survey to identify transmission sites for intestinal schistosomiasis on Ijinga Island, Mwanza, north-western Tanzania. Acta Trop. 2019; 105289. doi:10.1016/j.actatropica.2019.105289

Fuss A, Mazigo HD, Mueller A. Evaluation of serum-based real-time PCR to detect *Schistosoma mansoni* infection before and after treatment. Infect Dis Poverty. 2020;9: 74. doi:10.1186/s40249-020-00698-z

Zudem wurde folgendes Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht:

Fuss A, Mazigo HD, Mueller A. „Real-Time PCR detection of *Schistosoma mansoni* DNA from serum samples and dried blood spot cards of an adult population in North-western Tanzania“ bei PLoS ONE am 04. März 2020

9.2 Kongressbeiträge

1. Do HIV co-infections affect the diagnosis of *Schistosoma mansoni*? **Fuss A.**, Mazigo H.D., Mueller A.; 29th Annual Meeting of the German Society for Parasitology, 2020
2. Detection and quantification of *Schistosoma mansoni* DNA using Real-Time PCR in human blood samples pre and post treatment, **Fuss A.**, Mazigo H.D., Mueller A.; 11th European Congress on Tropical Medicine & International Health (ECTMIH), 2019 sowie 11th CUHAS – Bugando Graduation Scientific Conference, 2019
3. Prevalence and intensity of *Schistosoma* infection on Ijinga Island, Magu district, North-western Tanzania, after an intensified treatment protocol with Praziquantel, Mueller A., **Fuss A.**, Mazigo H.D.; ECTMIH 2019 sowie 11th CUHAS – Bugando Graduation Scientific Conference, 2019

4. *Schistosoma mansoni* infection rate in *Biomphalaria sudanica* after intensified treatment with praziquantel within the SchistoControl program on Ijinga Island, Magu district, North-western Tanzania, **Fuss A.**, Mazigo H.D., Mueller A.; 10th CUHAS – Bugando Graduation Scientific Conference, 2018
5. *Schistosoma mansoni* infection among preschool-aged children on Ijinga Island, Northwest Tanzania: prevalence and intensity of infection, **A. Fuss**, H.D. Mazigo, G.M. Kaatano, A. Mueller; 28th Annual Meeting of the German Society for Parasitology, 2018
6. Prevalence of *Schistosoma mansoni*, Soil-Transmitted Helminths and Intestinal Protozoa - Baseline data of the Ijinga Island Schistosomiasis Elimination Pilot Study, Northwestern Tanzania; C. Mechler, **A. Fuss**, H.D. Mazigo, A. Mueller; 28th Annual Meeting of the German Society for Parasitology, 2018
7. Environmental monitoring of *Schistosoma mansoni* infection rate in *Biomphalaria sudanica* – results of the Ijinga Island Schistosomiasis Elimination Pilot Study, Mwanza, North-western Tanzania, **Fuss A.**, Mazigo H.D., Kasang C., Mueller A.; 10th ECTMIH, 2017
8. Preliminary results of an intensified praziquantel treatment regimen aiming to eliminate schistosomiasis on Ijinga Island, Lake Victoria, Tanzania, Mueller A., **Fuss A.**, Kaatano G., Kasang C., Mazigo H.D., 10th ECTMIH, 2017
9. Performance of the commercial *Schistosoma*-Urine-CCA-test in comparison to Kato-Katz technique and PCR in a high prevalence region of *Schistosoma mansoni* at Lake Victoria, Tanzania, **Fuss A.**, Mazigo H.D., Tappe D., Kasang C., Mueller A., 13. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin (KIT), 2016

10. Danksagung

Ohne die Unterstützung zahlreicher Personen und Institutionen hätte die vorliegende Arbeit in dieser Form nicht realisiert werden können. Für die vielfältig erfahrene Hilfe möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinen beiden Doktorvätern Prof. Dr. Brehm und Prof. Dr. Stigloher, die sich bereit erklärt haben die Betreuung meiner Doktorarbeit zu übernehmen und mich stets mit konstruktiven Anregungen unterstützt haben.

Für vielfältige Unterstützung bin ich dem Missionsärztlichen Institut verbunden, welches die Rahmenbedingungen für meine Arbeit geboten und meine Arbeit kontinuierlich unterstützt hat. Meinen Kollegen danke ich für die wissenschaftlichen Diskussionen, das Korrekturlesen meiner Manuskripte, die Bereitstellung von Fachliteratur, die Organisation der Reisen und vorallem für den moralischen Beistand und die Motivation!

Dr. Mazigo, dem Leiter der Parasitologie der Catholic University of Health and Allied Sciences, Mwanza, Tansania gilt mein besonderer Dank. Ohne seine Unterstützung und seinen Zuspruch wäre das Projekt in Tansania nicht durchführbar gewesen.

Ein großer Dank gilt auch dem „Laborteam“ vor Ort für die großartige Arbeit, die sie geleistet haben. Ein besonderer Dank gilt allen Teilnehmern und Teilnehmerinnen meiner Studien, ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Forschung möchte ich der Georg Ludwig Rexroth-Stiftung und dem Deutschen Akademischen Ausstauschdienst (DAAD) danken.




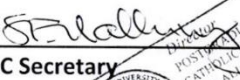


Mein besonderer Dank gilt schließlich meiner Familie, die fortwährend an mich geglaubt und mich uneingeschränkt unterstützt hat.

Der größte Dank gebührt Dr. Müller für die inhaltliche Ausrichtung, die permanente wissenschaftliche Betreuung und die kontinuierliche Disskusions- und Hilfsbereitschaft! Sein großes Engagement, die fachlichen Hinweise und das professionelle Lektorat haben wesentlich zum erfolgreichen Abschluss der Arbeit beigetragen. Ihm ist diese Studie gewidmet.

11. Anhang

11.1 Ethik

11.1.1 Genehmigung der Ethikkommission für die Studie „Comparison of sensitivity and specificity of three diagnostic tests to detect *Schistosoma mansoni* infections in school children in Mwanza region, Tanzania“

	CATHOLIC UNIVERSITY OF HEALTH AND ALLIED SCIENCES BUGANDO	
P.O. Box 1464	Phone: (255) 28-250-0881	Email: principal@bugando.ac.tz
Mwanza, Tanzania	Fax: (255) 28-250-2678	Website: www.bugando.ac.tz
CUHAS/BMC RESEARCH & ETHICAL COMMITTEE (CREC) ETHICAL CLEARANCE FORM		
Date	5 March 2015	
Research Clearance Certificate No	CREC/062/2014	
Name of researcher/PI	Antje Fuss	
Purpose of the research	Pilot study	
Title of the Research	Pilot study to evaluate the sensitivity of a modified technique of <i>Schistosoma</i> CCA detection in urine	
Budget and Sponsor(s)	US\$ 14,010/= Wuerzburg Medical Mission Institute	
Research period	March 2015 to August 2015	
Ethical clearance is hereby granted.		
A progress report shall be submitted to the Committee every 6 months.		
 CREC Chairperson	 CREC Secretary	
		

11.1.2 Genehmigungen der Ethikkommissionen für die Studie „Diagnostic accuracy and applicability of molecular approaches for the detection of schistosome DNA in human blood and urine samples pre- and post-treatment“

 CATHOLIC UNIVERSITY OF HEALTH AND ALLIED SCIENCES BUGANDO 		
P.O. Box 1464	Phone: (255) 28-250-0881	Email: principal@bugando.ac.tz
Mwanza, Tanzania	Fax: (255) 28-250-2678	Website: www.bugando.ac.tz
CUHAS/BMC RESEARCH & ETHICAL COMMITTEE (CREC) ETHICAL CLEARANCE FORM		
Date	19 th September 2017	
Research Clearance Certificate No	CREC/243/2017	
Name of researcher/PI	Antje Fuss	
Purpose of the research	RES	
Title of the Research	Diagnostic Accuracy and Applicability of Molecular Approaches for detection of Schistosome DNA in Human Blood and Urine Samples Pre- and Post- Treatment	
Budget and Sponsor (s)	€ 59.932 Rexroth Foundation	
Research period	September 2017 to August 2018	

Ethical clearance is hereby granted.

A progress report shall be submitted to the relevant Directorate every 6 months.


CREC Chairperson



CREC Secretary




THE UNITED REPUBLIC
OF TANZANIA



National Institute for Medical Research
3 Barack Obama Drive
P.O. Box 9653
11101 Dar es Salaam
Tel: 255 22 2121400
Fax: 255 22 2121360
E-mail: ethics@nimr.or.tz

Ministry of Health, Community
Development, Gender, Elderly & Children
University of Dodoma, Faculty of Arts
and Social Sciences
Building No 11
P.O. Box 743
40478 Dodoma

NIMR/HQ/R.8a/Vol. IX/2679

23rd January 2018

Dr. Andreas Mueller
Department of Tropical Medicine, Medical Mission Hospital
Wuerzburg, Germany
C/o Dr. Humphrey Mazigo
Department of Medical Parasitology and Entomology,
Catholic University of Health and Allied Sciences (CUHAS)
P. O. Box 1464
Mwanza

**RE: ETHICAL CLEARANCE CERTIFICATE FOR CONDUCTING
MEDICAL RESEARCH IN TANZANIA**

This is to certify that the research entitled: Diagnostic accuracy and applicability of molecular approaches for the detection of schistosome DNA in human blood and urine samples pre and post-treatment (Mueller A *et al*) whose local investigator is Dr. Humphrey Mazigo of CUHAS has been granted ethical clearance to be conducted in Tanzania.

The Principal Investigator of the study must ensure that the following conditions are fulfilled:

1. Progress report is submitted to the Ministry of Health, Community Development, Gender, Elderly & Children and the National Institute for Medical Research, Regional and District Medical Officers after every six months.
2. Permission to publish the results is obtained from National Institute for Medical Research.
3. Copies of final publications are made available to the Ministry of Health, Community Development, Gender, Elderly & Children and the National Institute for Medical Research.
4. Any researcher, who contravenes or fails to comply with these conditions, shall be guilty of an offence and shall be liable on conviction to a fine as per NIMR Act No. 23 of 1979, PART III Section 10(2).
5. Site: Mwanza Region.

Approval is valid for one year: 23rd January 2018 to 22nd January 2019.

Name: Prof. Yunus Daud Mgaya

Name: Prof. Muhammad Bakari Kambi

Signature
CHAIRPERSON
MEDICAL RESEARCH
COORDINATING COMMITTEE

Signature
CHIEF MEDICAL OFFICER
MINISTRY OF HEALTH, COMMUNITY
DEVELOPMENT, GENDER, ELDERLY &
CHILDREN

CC: RMO of Mwanza
DMO/DED of Ilemela

11.1.3 Genehmigungen der Ethikkommissionen für die Studien auf der Insel Ijinga unter dem Titel „Proof of concept study on sustainable schistosomiasis elimination through an integrated community based approach on Ijinga Island, Mwanza, Northwestern Tanzania“

LAKE ZONE INSTITUTIONAL REVIEW BOARD (LZIRB)



National Institute for Medical Research
Mwanza Medical Research Centre
P.O. Box 1462, Mwanza
Tel: +255 28 2541935
Fax: +255 28 2500654
e-mail: mwanza@nimr.or.tz

MR/53/100/434

Dr Humphrey Mazigo
CUHAS-Bugando
P.O. Box 1464
Mwanza -Tanzania

7th September 2016

CLEARANCE CERTIFICATE FOR CONDUCTING MEDICAL RESEARCH

This is to certify that the research titled “**Proof of concept study on sustainable schistosomiasis and soil-transmitted helminths elimination through an integrated community based approach in Ijinga Island, Mwanza, northwestern Tanzania (Mazigo H et al)**” has been granted ethics clearance by LZIRB.

The Principal Investigator (PI) of the study must ensure that the following conditions are fulfilled:

1. Progress report is submitted to the Ministry of Health and Mwanza Medical Research Centre, Regional and District Medical Officers after every six months.
2. Permission to publish the results is obtained from NIMR Headquarters.
3. Copies of final publications are made available to the Ministry of Health & Social Welfare Mwanza Medical Research Centre and the National Institute for Medical Research Headquarters.
4. Any researcher, who contravenes or fails to comply with these conditions, shall be guilty of an offence and shall be liable on conviction to a fine. NIMR Act No. 23 of 1979, PART III Section 10(2).
5. Approval is for this study, any other changes should be communicated to the Board for approval.
6. Study site: Ijinga island, Magu district, Mwanza region, Tanzania

Approval is for one year: 7th September 2016 to 6th September 2017.

Name: Dr Sophia Kalokola

Name: Mr Mansuet Temu

Signature: _____

Chairperson

CC; Regional Medical Officer
District Medical Officer

Signature: _____

Secretary

LAKE ZONE INSTITUTIONAL REVIEW BOARD (LZIRB)



National Institute for Medical Research

Mwanza Medical Research Centre

P.O. Box 1462, Mwanza

Tel: +255 28 2541935

Fax: +255 28 2500654

e-mail: mwanza@nimr.or.tz

MR/53/100/504

Dr Humhrey Mazigo
CUHAS-Bugando
P.O. Box 1464
Mwanza-Tanzania

6th February 2018

APPROVAL FOR EXTENSION OF ETHICAL CLEARANCE

This letter is to confirm that your application for extension on the already approved proposal: **Proof of concept study on sustainable schistosomiasis and soil-transmitted helminths elimination through an integrated community based approach in Ijinga Island, Mwanza, northwestern Tanzania (Mazigo H et al)** has been granted extension of approval.

The extension approval is based on the progress report dated 31st January 2018. Extension is valid until **6th September 2018**

The Principal Investigator must bear in mind that other conditions of approval remain as per ethical clearance letter. The Principal Investigator must ensure that progress and final reports are submitted in a timely manner.

Name: Dr Sophia Kalokola

Name: Mr Mansuet Temu

Signature: _____

Chairperson

cc: Regional Medical Officer
District Medical Officer

Signature: _____

Secretary

LAKE ZONE INSTITUTIONAL REVIEW BOARD (LZIRB)



National Institute for Medical Research
Mwanza Medical Research Centre
P.O. Box 1462, Mwanza
Tel: +255 28 2541935
Fax: +255 28 2500654
e-mail: mwanza@nimr.or.tz

MR/53/100/577

Dr Humfrey Mazigo
CUHAS-Bugando
P.O. Box 1464
Mwanza-Tanzania

15th February 2019

APPROVAL FOR EXTENSION #2 OF ETHICAL CLEARANCE

This certificate is to confirm that your application for extension 02 of the already approved study titled "**Proof of concept study on sustainable schistosomiasis and soil-transmitted helminths elimination through an integrated community based approach in Ijinga Island, Mwanza, northwestern Tanzania (Mazigo H *et al*)**" has been granted approval of extension.

The extension approval is based on the annual report which was submitted to LZIRB. Extension is valid until **6th September 2019**

The Principal Investigator must bear in mind that other conditions of approval remain as per ethical clearance letter. The Principal Investigator must ensure that progress and final reports are submitted in a timely manner.

Name: Dr Sophia Kalokola

Name: Mr Mansuet Temu

Signature: _____

Chairperson

cc: Regional Medical Officer
District Medical Officer

Signature: _____

Secretary

LAKE ZONE INSTITUTIONAL REVIEW BOARD (LZIRB)



National Institute for Medical Research

Mwanza Medical Research Centre

P.O. Box 1462, Mwanza

Tel: +255 28 2541935

Fax: +255 28 2500654

e-mail: mwanza@nimr.or.tz

MR/53/100/628

Dr Humphrey Mazigo
CUHAS-Bugando
P.O. Box 1464
Mwanza-Tanzania

8th October 2019

APPROVAL FOR EXTENSION 03 OF ETHICAL CLEARANCE

This certificate is to confirm that your application for extension 03 of the already approved proposal titled: "**Proof of Concept study on sustainable schistosomiasis and soil-transmitted helminthes elimination through an integrated community-based approach in Ijinga Island, Mwanza, Northern Western Tanzania, Mazigo H *et al***" has been granted approval of extension.

The extension is based on the annual report which was submitted to LZIRB in October 2019. This approval is valid until **6th September 2020**

The Principal Investigator must bear in mind that other conditions of approval remain as per ethical clearance letter. The Principal Investigator must ensure that progress and final reports are submitted in a timely manner.

Name: Dr Sophia Kalekola

Name: Dr Rebecca Balira

Signature: _____
Chairperson

Signature _____
Secretary

cc: Regional Medical Officer
District Medical Officer



**CATHOLIC UNIVERSITY OF HEALTH
AND ALLIED SCIENCES
BUGANDO**



P.O. Box 1464

Phone: (255) 28-250-0881

Email: principal@bugando.ac.tz

Mwanza, Tanzania

Fax: (255) 28-250-2678

Website: www.bugando.ac.tz

**CUHAS/BMC RESEARCH & ETHICAL COMMITTEE (CREC)
ETHICAL CLEARANCE**

Date	23 FEBRUARY 2016
Research Clearance Certificate No	CREC/112/2016
Name of researcher/PI	ANDREAS MUELLER
Purpose of the research	PROPOSAL RESEARCH
Title of the Research	PROOF OF CONCEPT STUDY ON SUSTAINABLE SCHISTOSOMIASIS THROUGH AN INTEGRATED COMMUNITY BASED APPROACH IN IJINGA ISLAND, MWANZA - TANZANIA - PART I.
Budget and Sponsor(s)	MEDICAL MISSION HOSPITAL WUERZBURG - GERMANY
Research period	February 2016 to December 2016

Ethical clearance is hereby granted.

A progress report shall be submitted to the Committee every 6 months.


CREC Chairperson
 Director
 RESEARCH AND PUBLICATION
 CATHOLIC UNIVERSITY OF HEALTH
 AND ALLIED SCIENCES - BUGANDO
 P.O. BOX 1464
 MWANZA, TANZANIA.


CREC Secretary
 Director
 POSTGRADUATE STUDIES
 CATHOLIC UNIVERSITY OF HEALTH
 AND ALLIED SCIENCES - BUGANDO
 P.O. BOX 1464
 MWANZA, TANZANIA.



**CATHOLIC UNIVERSITY OF HEALTH
AND ALLIED SCIENCES
BUGANDO**



P.O. Box 1464

Phone: (255) 28-250-0881

Email: principal@bugando.ac.tz

Mwanza, Tanzania

Fax: (255) 28-250-2678


Website: www.bugando.ac.tz

**CUHAS/BMC RESEARCH & ETHICAL COMMITTEE (CREC)
ETHICAL CLEARANCE**

Date	22 SEPTEMBER 2016
Research Clearance Certificate No	CREC/156/2016
Name of researcher/PI	ANDREAS MUELLER
Purpose of the research	NOT FOR DEGREE PURPOSE
Title of the Research	PROOF OF CONCEPT STUDY ON SUSTAINABLE SCHISTOSOMIASIS AND SOIL-TRANSMITTED HELMINTHS ELIMINATION THROUGH AN INTERGRATED COMMUNITY BASED APPROACH IN IJINGA ISLAND, MWANZA – NORTH WESTERN TANZANIA
Budget and Sponsor(s)	TSHS. 36.900.000/= SELF
Research period	SEPTEMBER 2016 to SEPTEMBER 2017

Ethical clearance is hereby granted.

A progress report shall be submitted to the Committee every 6 months.


CREC Chairperson
 RESEARCH AND PUBLICATION
 CATHOLIC UNIVERSITY OF HEALTH
 AND ALLIED SCIENCES - BUGANDO
 P.O. BOX 1464
 MWANZA, TANZANIA.


CREC Secretary
 Director
 GRADUATE STUDIES
 CATHOLIC UNIVERSITY OF HEALTH
 AND ALLIED SCIENCES - BUGANDO
 P.O. BOX 1464
 MWANZA, TANZANIA.

11.2 Aufklärungsbogen & Einverständniserklärung (Beispiel)

PARTICIPANT INFORMATION SHEET & CONSENT FORM

Study title

Diagnostic accuracy and applicability of molecular approaches for the detection of schistosome DNA in human blood and urine samples pre- and post-treatment

Invitation paragraph

You are being invited to take part in a research study. Before you decide it is important for you to understand why the research is being done and what it will involve. Please take time to read the following information carefully. Take time to decide whether or not you wish to take part. Thank you for reading this.

Why is this study being done?

Schistosomiasis is a common parasitic disease in Tanzania. Schistosome infections may lead to reduced physical and cognitive development in children, decreased productivity of adults, organ damage, major morbidity, and in some cases, death. Early detection of parasite infestation and early treatment is important to prevent morbidity and mortality. The currently available tests are not sensitive enough to detect low infection levels.

In this study we want define the best diagnostic material to diagnose schistosomiasis and evaluate the sensitivity of molecular biological test systems.

If you are diagnosed to be infected, you will be treated with the recommended drug Praziquantel.

Do I have to take part?

It is up to you to decide whether or not to take part. If you do decide to take part you will be given this information sheet and be asked to sign a consent form. If you decide to take part you are still free to withdraw at any time and without giving a reason. A decision to withdraw at any time, or a decision not to take part, will not affect the standard of care you receive.

How many people will take part in the study?

About 300 adults will take part in this study.

What will happen if I take part in this research study?

If you decide to take part in the study a morning urine sample, a stool specimen and blood and serum samples will be requested.

How long will I be in the study?

All procedures and tests will be performed three times.

Can I stop being in the study?

Yes. You can decide at any time to withdraw your consent. The data obtained from you will be removed from the study data base and the specimen obtained will be destroyed.

What side effects or risks can I expect from being in the study?

To provide stool and urine specimen for laboratory investigations does not bear any risks for you. Taking the requested blood sample may cause minor discomfort due to the required

needle prick. It is a routine medical procedure and will be carried out by experienced medical staff with sterile disposable material. In case you are diagnosed to have a schistosoma infection you will be offered treatment with praziquantel. This is the WHO recommended drug of choice. It is the drug which is currently used in mass treatment campaigns and you may have received it already before. The side effects of a treatment with praziquantel are rare and usually mild. They may consist of abdominal or stomach discomfort with or without nausea for 1 or 2 days.

Are there personal benefits to taking part in the study?

The laboratory investigations are looking for active schistosomiasis, a worm disease that can reliably be treated with drugs. The rapid diagnostic tests will provide a result within a few days and you will receive a report as soon as possible. In case an active infection is found you will receive the appropriate medication free of charge. If you wish your study doctor will discuss the results of the laboratory tests with you. Some of the specialized tests will be done outside of Tanzania and the results may take a long time, e.g. several months. All results will be made available to you and your doctor as soon as possible. Participation in the offered HIV-Tests will provide information about your HIV-status. Due to the anticipated prevalence of HIV in your community this is a very important health information for you. This will allow you to participate in treatment programs and to protect your partner if you are found to be HIV-positive. HIV treatment and care is offered free of charge by a Tanzanian national program. If an HIV-infection goes unrecognized it may advance to a serious, life-threatening disease.

What other choices do I have if I do not take part in this study?

Your physician will treat you according to your clinical needs and absolutely independent from your decision to take part in the study.

Will my medical information and my taking part in this study be kept confidential?

All information that is collected about you during the course of the research will be kept strictly confidential. Any information about you which leaves the hospital/surgery will have your name and address removed so that you cannot be recognized by a third party.

What are the costs of taking part in this study?

You will not need to pay for any study specific procedures.
You will not be paid for taking part in this study.

What happens if I am injured because I took part in this study?

As pointed out above it is very unlikely that you will be harmed or injured due to study specific procedures. But if you feel so, it is important that you tell your study doctor, _____ (*investigator's name*). You can tell the doctor in person or call him/her at _____ [*telephone number*].

What are my rights if I take part in this study?

Taking part in this study is your choice. You may choose either to take part or not to take part in the study. If you decide to take part in this study, you may withdraw your consent at any time. In this case your data will be removed from the study database and your specimens destroyed.

No matter what decision you make, there will be no penalty for you and you will not lose any of your regular benefits. Withdrawing your consent will not affect your medical care. You can still get your medical care from our institution.

Who can answer my questions about the study?

You can talk to your study doctor about any questions or concerns you have about this study. Contact your study doctor _____ [name] at _____ [telephone number].

Additional Information about your rights while taking part in this study, can be obtained by the Institutional Review Board of the Catholic University of Health and Allied Sciences (CUHAS).

Please give your consent

Name of participant: _____

Date of birth: _____

Study number: _____

Signature

I have been given a copy of all 3 pages of this form. I have read it or it has been read to me. I understand the information and have had my questions answered.

I agree to take part in this study. YES

Date _____

Signature of participant: _____

Signature of witness: _____

(In case of an illiterate participant only)