

Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin  
Leiter: Prof. Dr. Thomas Löscher

der Medizinischen Poliklinik - Innenstadt  
Komm. Direktor: Prof. Dr. Martin Reincke

der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Immundiagnostik der Schistosomiasis mit der mikrosomalen  
Antigenfraktion der Adultwürmer von *Schistosoma mansoni***

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

vorgelegt von  
Claas Scharmann  
aus Stuttgart  
2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Thomas Löscher
Mitberichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Sören Schubert
Betreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. rer. nat. Susanna Eichenlaub
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	10.11.2011

**Meinem Vater**

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Definition der Schistosomiasis	1
1.2	Erreger und Entwicklungszyklus	1
1.3	Zwischenwirt	6
1.4	Epidemiologie, Morbidität und Mortalität	7
1.5	Geografische Verbreitung	8
1.6	Pathogenese	10
1.6.1	Penetrationsphase	11
1.6.2	Akute Phase	11
1.6.3	Chronische Phase	12
1.7	Pathologie und Klinik der Schistosomiasis	13
1.7.1	Zerkariendermatitis	14
1.7.2	Akute Schistosomiasis (Katayama-Syndrom)	14
1.7.3	Urogenitale Schistosomiasis (Blasenbilharziose)	15
1.7.4	Intestinale Schistosomiasis (Darmbilharziose)	17
1.7.5	Hepato lienale Schistosomiasis (Hepato lienale Bilharziose)	19
1.7.6	Lungenschistosomiasis (Lungenbilharziose)	20
1.7.7	Schistosomiasis des zentralen Nervensystems	20
1.8	Therapie	21
1.8.1	Praziquantel (z.B. Biltricide®)	21
1.8.2	Oxamniquin (z.B. Mansil®)	23
1.8.3	Metrifonat (z.B. Bilarcil®)	23
1.8.4	Artesunat	24
1.9	Verhütung und Bekämpfung	24
1.10	Diagnostik	25
1.10.1	Allgemeine Laboruntersuchungen	25
1.10.2	Bildgebende Diagnostik	26
1.10.3	Mikrobiologische Diagnostik	26
1.10.3.1	Direkte Methoden	27
1.10.3.1.1	Einachweis im Urin	27
1.10.3.1.2	Einachweis im Stuhl	28
1.10.3.1.3	Nachweis von Mirazidien (Mirazidienschlüpfversuch)	28

1.10.3.1.4	Einachweis in Biopsien	28
1.10.3.2	Indirekte Methoden	29
1.10.3.2.1	Indirekte Hämagglutination (IHA)	29
1.10.3.2.2	Indirekter Fluoreszenz-Test (IFT)	30
1.10.3.2.3	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	30
1.10.3.2.4	Enzyme-linked Immunoelctrotransfer blot (EITB)	33
1.10.4	Probleme der Diagnostik	35
1.10.4.1	Antikörperrnachweis	35
1.10.4.2	Antigennachweis	35
1.10.4.3	Molekularbiologische Diagnostik	36
2	Problemstellung und Zielsetzung	38
3	Material und Methoden	40
3.1	Serumproben	40
3.1.1	Serumproben mit nachgewiesener Schistosomeninfektion	40
3.1.2	Serumproben mit nachgewiesenen anderen Helminthosen	41
3.1.3	Negativkontrolle	42
3.2	Antigen	42
3.2.1	Antigengewinnung für die mikrosomale Fraktion (Tsang et al., 1983)	42
3.2.2	Verarbeitung der adulten <i>Schistosoma mansoni</i>	44
3.2.3	Antigengewinnung für das SEA-Antigen	46
3.3	Proteinbestimmung nach Ohnishi (Ohnishi et al., 1978)	47
3.4	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	47
3.4.1	Konzentration des Antigens	49
3.4.2	Verdünnung der Seren für die Beschichtung mit SEA-Antigen	49
3.4.3	Verdünnung der Seren für die Beschichtung mit MAMA-Antigen	49
3.4.4	Testansatz und Ausführung	49
3.5	Natrium Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Enzyme-linked Immunoelctrotransfer blot (EITB)	50
3.5.1	Polyacrylamid-Gradientengel	51
3.5.2	Gelelektrophorese	52
3.5.3	Enzyme-linked immunoelctrotransfer blot (EITB) (Westernblot)	53
3.5.4	Färben des Gels	54
3.5.5	Verarbeitung der Membran-Folie	55
3.5.6	Verarbeitung der Westernblot-Streifen	56

4	Ergebnisse	58
4.1	ELISA-Ergebnisse	58
4.1.1	ELISA mit Serumproben der Patienten mit einer nachgewiesenen Schistosomeninfektion	58
4.1.1.1	Vergleich von Sensitivität und Spezifität aller getesteten Proben im SEA- und MAMA-ELISA	58
4.1.1.2	Proben von deutschen Patienten, die in einem Zeitraum von sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden	60
4.1.1.2.1	Vergleich von Sensitivität und Spezifität	60
4.1.1.3	Proben von deutschen Patienten, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden	60
4.1.1.3.1	Vergleich von Sensitivität und Spezifität	60
4.1.1.4	Proben von Patienten aus Endemiegebieten	61
4.1.1.4.1	Vergleich von Sensitivität und Spezifität	61
4.1.2	Patienten aufgeteilt nach <i>S. mansoni</i> - und <i>S. haematobium</i> -Infektionen	61
4.1.2.1	Ergebnisse aller getesteten Proben von <i>S. mansoni</i> -Patienten	62
4.1.2.2	Ergebnisse aller getesteten Proben von <i>S. haematobium</i> -Patienten	62
4.1.2.3	Ergebnisse aller Proben von deutschen <i>S. mansoni</i> -Patienten	62
4.1.2.4	Proben von deutschen <i>S. mansoni</i> -Patienten, die in einem Zeitraum von sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden	62
4.1.2.5	Proben von deutschen <i>S. mansoni</i> -Patienten, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden	62
4.1.2.6	Ergebnisse aller Proben von deutschen <i>S. haematobium</i> -Patienten	63
4.1.2.7	Probe von einem deutschen <i>S. haematobium</i> -Patienten, die in einem Zeitraum von sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden	63
4.1.2.8	Proben von deutschen <i>S. haematobium</i> -Patienten, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden	63
4.1.2.9	Ergebnisse aller Proben von Patienten aus Endemiegebieten mit einer <i>S. mansoni</i> -Infektion	63

4.1.2.10	Ergebnisse aller Proben von Patienten aus Endemiegebieten mit einer <i>S. haematobium</i> -Infektion	63
4.1.3	ELISA mit Serumproben der Patienten mit nachgewiesenen anderen Helminthosen	64
4.1.3.1	Ergebnisse aller getesteten Proben	64
4.1.3.2	Ergebnisse der Proben von Patienten aus Nichtendemiegebieten mit anderen Helminthosen	66
4.1.3.3	Ergebnisse der Proben von Patienten aus Endemiegebieten mit anderen Helminthosen	68
4.1.3.4	Ergebnisse der Negativ-Kontrolle	69
4.1.4	Darstellung der Sensitivität und Spezifität der einzelnen Patientengruppen im Überblick	70
4.2	Enzyme-linked Immunoelctrotransfer blot (EITB) (Westernblot)	72
4.2.1	Ergebnisse des Enzyme-linked Immunoelctrotransfer blot (EITB) und ELISA mit MAMA-Antigen	73
4.2.1.1	Auswertung der Proben von deutschen Patienten, die in einem Zeitraum von sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden	73
4.2.1.2	Auswertung der Proben von deutschen Patienten, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden	74
4.2.1.3	Auswertung der Patientenproben aus Endemiegebieten	74
4.2.2	Patienten aufgeteilt nach <i>S. mansoni</i> - und <i>S. haematobium</i> -Infektionen im EITB	74
4.2.2.1	Auswertung der getesteten Proben von <i>S. mansoni</i> -Patienten im EITB und ELISA	75
4.2.2.2	Auswertung der getesteten Proben von <i>S. haematobium</i> -Patienten im EITB und ELISA	75
4.2.2.3	Auswertung der Proben von deutschen <i>S. mansoni</i> -Patienten im EITB und ELISA	76
4.2.2.4	Auswertung der Proben von deutschen <i>S. haematobium</i> -Patienten im EITB und ELISA	76
4.2.2.5	Auswertung der Proben von Patienten aus Endemiegebieten mit einer <i>S. mansoni</i> -Infektion im EITB und ELISA	76

4.2.2.6	Auswertung der Proben von Patienten aus Endemiegebieten mit einer <i>S. haematobium</i> -Infektion im EITB und ELISA	77
4.2.3	Patienten mit anderen Helminthosen im EITB und ELISA	77
4.2.3.1	Auswertung der Proben von Patienten, die nicht aus Endemiegebieten stammen mit anderen Helminthosen	77
4.2.3.2	Auswertung der Proben von Patienten aus Endemiegebieten mit anderen Helminthosen	78
4.2.4	Auswertung der Negativ-Kontrolle	78
4.3	Enzyme-linked Immunoelctrotransfer blot (EITB) mit SEA-Antigen	79
5	Diskussion	80
5.1	Herstellung des MAMA-Antigens	81
5.2	Sensitivität des ELISA	81
5.3	Sensitivität in Bezug auf die Spezies ( <i>S. mansoni</i> und <i>S. haematobium</i> ) und Herkunftsland der Patienten im ELISA	82
5.4	Spezifität des ELISA	84
5.5	Antikörpertiter im Verlauf	85
5.6	Enzyme-linked Immunoelctrotransfer blot (EITB)	86
5.7	Schlussfolgerungen	88
6	Zusammenfassung	90
7	Abkürzungsverzeichnis	93
8	Abbildungsverzeichnis	95
9	Literaturverzeichnis	98
10	Danksagung	109

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition der Schistosomiasis

Die Schistosomiasis (Bilharziose) umfasst eine Gruppe von Krankheiten, die durch humanpathogene Trematoden der Familie Schistosomatidae verursacht werden. Man unterscheidet nach dem Krankheitsbild und der Lokalisation der Schistosomen zwei Hauptformen (Davis, 1996; Löscher et al., 2000; Gryssels et al., 2006; Richter et al., 2010).

- Die Blasenbilharziose, verursacht durch *Schistosoma haematobium*
- Die Darmbilharziose hervorgerufen durch *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma intercalatum* und *Schistosoma mekongi*

Die Infektion des Menschen erfolgt bei Gewässerkontakt durch Eindringen von Schistosomen-Zerkarien in die Haut.

Die Schistosomiasis stellt weltweit die bedeutendste Wurmerkrankung dar und gehört zu den wichtigsten Tropenkrankheiten. Die Weltgesundheitsorganisation schätzt die Zahl der Infizierten auf mehr als 200 Millionen Menschen (Steinmann et al., 2006; WHO 2010).

Nach dem deutschen Arzt Theodor Bilharz, der 1851 *S. haematobium* im Blutgefäßsystem des Menschen im Kasr el Aini Hospital in Kairo entdeckte, wird die Schistosomiasis auch als Bilharziose bezeichnet (Davis, 1996; Eckert, 1998). Die Krankheitsbilder der Schistosomiasis sind schon lange bekannt, so wird z.B. von „blutigem Urin“ in altägyptischen Papyri berichtet und in 3000 Jahre alten ägyptischen Mumien konnten verkalkte Schistosomen-Eier nachgewiesen werden. (Löscher et al., 2000).

## 1.2 Erreger und Entwicklungszyklus

Die Schistosomen gehören innerhalb des Stammes der Plathelminthen (Plattwürmer) zur Klasse der Trematoden (Saugwürmer). Man unterscheidet fünf verschiedene humanpathogene Schistosomenarten (Mahmoud et al., 1990; Mahmoud, 1992; Davis, 1996).

- *Schistosoma mansoni*
- *Schistosoma haematobium*
- *Schistosoma japonicum*

- *Schistosoma intercalatum*
- *Schistosoma mekongi*

Sie sind getrenntgeschlechtlich und der Entwicklungs- und Lebenszyklus stimmt bei den verschiedenen Arten im Wesentlichen überein (Löscher et al., 2000). Ausgewachsene Schistosomen sind 6-26 mm lange Würmer, bei denen das Männchen hellgrau und das Weibchen dunkelgrau bis schwarz erscheinen (Mahmoud et al., 1990). Die Schistosomen ernähren sich von Blut, dessen Verdauungsrückstand als schwarzbraunes Pigment ausgestoßen wird (Vogel et al., 1975; Richter et al., 2010). Die ausgewachsenen weiblichen Schistosomen sind länger als die männlichen Würmer; sie sind von zylindrischer Form und ihr Intestinaltrakt ist von verdauten Erythrozyten charakteristischer Weise schwarz gefärbt (Mahmoud et al., 1990). Das Männchen ist blattförmig und formt mit den Seitenrändern seines Körpers eine ventrale Rinne (Canalis gynaecophorus) aus, in der das mehr fadenförmige Weibchen aufgenommen wird (Abb. 1) (Cline, 1989; Eckert, 1998; Richter et al., 2010). Oral und ventral besitzen die Schistosomen einen Saugnapf, wobei diese zur Anheftung an das Gefäßendothel dienen. Die Mundöffnung liegt zentral im Bereich des oralen Saugnapfes, die in einen kurzen Ösophagus mündet und in zwei Darmschenkel aufzweigt. Diese vereinigen sich im distalen Bereich und enden blind (Cline, 1989; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Richter et al., 2010).

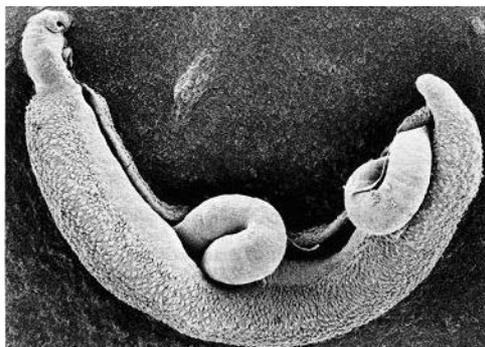


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Schistosomen-Pärchens (Mehlhorn et al. 1983)

Die einzelnen Schistosomen-Arten lassen sich aufgrund morphologischer Kriterien voneinander unterscheiden (Tab. 1) (Löscher et al., 2000). Die adulten männlichen

Schistosomen enthalten 4-8 Testes, die dorsal und posterior des ventralen Saugnapfes angeordnet sind. Bei den weiblichen Würmern kann zur Artdiagnose die Lokalisation der Ovarien, die Größe des Uterus und die Anzahl der Eier hinzugezogen werden (Mahmoud et al., 1990; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

Tabelle 1: Morphologische Merkmale der humanpathogenen Schistosomenarten (Löscher et al., 2000)

	<i>S. mansoni</i>	<i>S. japonicum</i>	<i>S. intercalatum</i>	<i>S. mekongi</i>	<i>S. haematobium</i>
<b>Männliche Adulte</b>					
Länge x	6-13 x	12-20 x	11-14 x	6-15 x	10-15 x
Dicke	1 mm	0,5 mm	0,4 mm	0,4 mm	1 mm
Tegument	höckerig	glatt	höckerig	glatt	feinhöckerig
Testes	4-13	6-7	4-6	6-7	4
<b>Weibliche Adulte</b>					
Länge x	7-17 x	12-28 x	10-14 x	6-20 x	20-26 x
Dicke	0,25 mm	0,3 mm	0,2 mm	0,25 mm	0,25 mm
Lage der Ovarien	in der vorderen Körperhälfte	in der Körpermitte	in der hinteren Körperhälfte	in der vorderen Körperhälfte	im hinteren Körperdrittel
Eizahl im Uterus	1-2	50-200	5-50	>50	10-100
<b>Eier</b>					
Form	spindelförmig mit Seitenstachel	rundelliptisch ohne Stachel	spindelförmig mit Endstachel	rundelliptisch ohne Stachel	spindelförmig mit Endstachel
Größe	115-170 x 40-70 µm	70-100 x 50-65 µm	140-240 x 50-85 µm	50-65 x 30-50 µm	110-170 x 40-70 µm

Das Integument der Schistosomen besteht aus einem Synzytium, dessen Oberfläche von einer doppelten Plasmamembran begrenzt ist (Mahmoud, 1992; Löscher et al., 2000). Jede dieser Membranen hat eine Dicke von ca. 7 nm. Aufgrund der intravasalen Lebensweise sind die Schistosomen der Immunabwehr besonders ausgesetzt. Um sich vor dieser zu schützen, lagern sie wirtseigene Moleküle in ihre

Oberfläche ein und sind somit für das Immunsystem nicht zu erkennen (Mahmoud et al., 1990; Mahmoud, 1992).

Die adulten Würmer halten sich in der Regel paarweise im Lumen von Blutgefäßen auf. Je nach Art sind sie bevorzugt in den mesenterialen Venengeflechten (*S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. mekongi*) oder in den Venengeflechten der Harnblase und Venen des kleinen Beckens (*S. haematobium*) lokalisiert (Cline, 1989; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Richter et al., 2010).

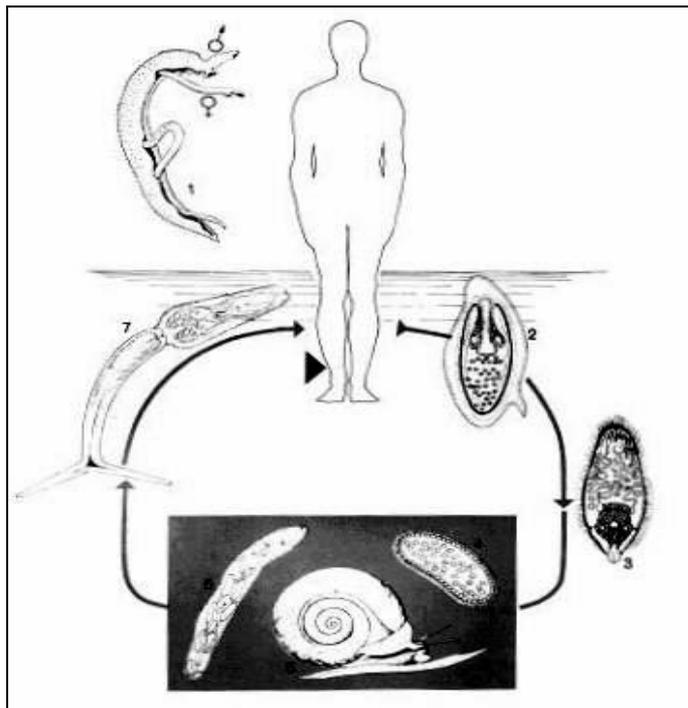
Die reifen Schistosomeneier enthalten jeweils ein Mirazidium (Wimpernlarve) und besitzen je nach Art einen lateralen oder terminalen Stachel (Tab. 1). Die Eischale besteht aus vernetzten Proteinen, die einen Stoffwchelsaustausch des Mirazidiums mit seiner Umgebung ermöglichen und das Ei vor der Immunabwehr schützen (Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996).

Die geschlechtsreifen Weibchen verlassen das Männchen und legen täglich, je nach Art, etwa 100-3500 Eier in die engen Kapillaren. Die tägliche Eiproduktion liegt bei *S. haematobium* bei ca. 240, bei *S. mansoni* bei ca. 300, bei *S. japonicum* bei ca. 3000 und *S. intercalatum* bei ca. 200 Eiern (Cline, 1989; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996). Diese reifen innerhalb von ca. 6-10 Tagen heran und bleiben ungefähr 3 Wochen lebensfähig (Mahmoud et al., 1990). In den Gefäßen liegen die Eier kettenförmig aneinandergereiht. Einem Teil der Eier gelingt es in das Endothel und das umliegende Gewebe zu penetrieren und sie gelangen somit in das Lumen des Darms und/oder der Harnblase. Am Penetrationsvorgang sind Enzyme beteiligt, die vom Mirazidium produziert und durch Mikroporen in der Eischale in die Umgebung ausgeschieden werden (Mahmoud, 1992; Eckert, 1998). Über die Stuhl- bzw. Harnausscheidung gelangen die Eier an die Außenwelt (Mahmoud et al., 1990).

Gelangen die Schistosomeneier auf diesem Weg in Süßwasser, schlüpfen die reifen Mirazidien aus der Eihülle (Cline, 1989; Mahmoud et al., 1990). Der Schlüpfvorgang wird durch Sonnenlicht stimuliert. Weiterhin sind die geeignete Temperatur (18-35°C), Salzkonzentration und pH-Bedingungen von Bedeutung (Mahmoud et al., 1990). Den Zwischenwirt finden die Mirazidien über chemotaktisch wirkende Moleküle, die von den Schnecken abgesondert werden (Mahmoud et al., 1990). Nach Kontakt mit der für jede Schistosomen-Art spezifischen Süßwasserschnecke penetriert das Mirazidium die Weichteile und wandelt sich in die primäre Sporozyste um. Die Sporozyste ist von schlauchförmiger Gestalt und mit zahlreichen Keimzellen gefüllt. Nach der Reifung rupturiert die primäre Sporozyste und setzt aus den

Keimzellen die sekundären Sporozysten frei. Diese wandern in die Leber und Ootestis der Schnecken und produzieren dort zahlreiche Zerkarien, die nach ca. 3-6 Wochen in das Wasser ausschwärmen (Cline, 1989; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996).

Die 400-600 µm langen Zerkarien bestehen aus einem kopfartigen Körper, mit einem oralen und ventralen Saugnapf und einem langen gegabelten Schwanz. Die Saugnäpfe dienen der Anhaftung an der Haut des Endwirts (Löscher et al., 2000). Die positiv phototaktischen frei umherschwimmenden (*S. haematobium* und *S. mansoni*) oder an der Wasseroberfläche haftenden (*S. japonicum*) Zerkarien dringen bei Kontakt mit menschlicher Haut mit Hilfe ausgeschiedener proteolytischer Enzyme und aktiver Bewegung in diese ein (Cline, 1989; Mahmoud, 1992; Richter et al., 2010). Während des Penetrationsvorgangs werden der Schwanz und die oberflächliche Glykokalix abgestreift und es kommt zur Umwandlung zum Schistosomulum (Mahmoud et al., 1990; Mahmoud, 1992; Richter et al., 2010). Dieses besitzt, wie die adulten Schistosomen, ebenfalls eine doppelte Plasmamembran (Mahmoud et al., 1990; Mahmoud, 1992; Davis, 1996). Diese schützt die Schistosomula gegen die lytische Aktivität des Komplementsystems im menschlichen Organismus, welches durch IgM aktiviert werden kann (Löscher et al., 2000). Nach der Durchwanderung des subkutanen Gewebes gelangen die Schistosomula in die venösen Kapillaren oder Lymphgefäße und wandern über den venösen Kreislauf und das rechte Herz in die Lunge (Cline, 1989; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996). Hämatogen gelangen sie nun in die intrahepatischen Aufzweigungen der Leber, wo die Schistosomula zu adulten Würmern heranwachsen. Kurz vor dem Erreichen der Geschlechtsreife kommt es zur Paarung von Männchen und Weibchen. Anschließend wandern die Schistosomen retrograd in die Mesenterialvenen bzw. in das Venengeflecht des kleinen Beckens (Cline, 1989; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010). Die Präpatenzzeit beträgt je nach Schistosomenart 4-10 Wochen. Die Lebenszeit der Schistosomen beträgt ca. 3-5 Jahre (Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996).



- 1) Männchen und Weibchen
- 2) Frisch ausgeschiedenes Ei mit Mirazidium
- 3) Mirazidium
- 4) Sporozyste im Zwischenwirt
- 5) Zwischenwirt (*Biomphalaria glabrata*)
- 6) Tochttersporozyste
- 7) Zerkarie

Abbildung 2: Entwicklungszyklus von *Schistosoma mansoni* nach Piekarski, 1973

### 1.3 Zwischenwirt

Zwischenwirte von *S. mansoni*, *S. haematobium* und *S. intercalatum* sind rein aquatisch lebende Lungenschnecken (Vogel et al., 1975; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

Alle Zwischenwirte für *S. mansoni* gehören der Gattung *Biomphalaria* an und zeichnen sich durch eine scheibenförmige, posthornähnliche Schale aus (Vogel et al., 1975). In Süd- und Mittelamerika sind drei Arten von *Biomphalaria* bedeutsam: *B. glabrata*, *B. straminea* und *B. tenagophila* (Cline, 1989; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Löscher et al., 2000). In Afrika und im Nahen Osten unterscheidet man vier Arten: *B. pfeifferi*, *B. choanomphala*, *B. alexandrina* und *B. sudanica* (Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Löscher et al., 2000). Die Schnecken bevorzugen stehende oder langsam fließende Gewässer, wo sie sich hauptsächlich in der seichten Uferzone aufhalten (Cline, 1989).

Die Zwischenwirte von *S. haematobium* und *S. intercalatum* sind Vertreter der Gattung *Bulinus* (Vogel et al., 1975; Farid, 1989; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996). Sie besitzen eine linksgewundene, ei- bis spindelförmige Schale (Vogel et al., 1975). Die *Bulinus*-Schnecken werden wiederum in drei Unterarten eingeteilt: *B. forskalii* (Arabien und Mauritius), *B. reticulatus* (Äthiopien) und der *B. truncatus*-B.

*tropicus Komplex* (Nordafrika und vorderer Orient) (Farid, 1989; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Löscher et al., 2000). Arten aller Gruppen kommen als Zwischenwirte in Westafrika vor (Löscher et al., 2000).

Die Zwischenwirte von *S. japonicum* können, obwohl es sich um Kiemenschnecken handelt, zeitweise außerhalb des Wassers in der Uferzone leben (Vogel et al., 1975). Es handelt sich um verschiedene Unterarten der Gattung *Oncomelania* (*O. hupensis* u.a.) die in China, Taiwan, Indonesien, Japan und auf den Philippinen vorgefunden wird (Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996). Ihre Schale ist spitz-konisch und an ihrer Öffnung mit einem beweglichen Deckel versehen (Vogel et al., 1975).

Die Schnecken, die *S. mekongi* als Zwischenwirt dienen, gehören zu der Gattung *Tricula aperta* (Kuntz, 1989; Mahmoud et al., 1990; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

Da alle Zwischenwirtschnecken Kälte- oder Frostperiode nicht überdauern können und die Wassertemperatur einen großen Teil des Jahres über 25 °C liegen muss, ist die Verbreitung der Schistosomiasis auf warme Klimate beschränkt (Vogel et al., 1975).

#### **1.4 Epidemiologie, Morbidität und Mortalität**

Die Schistosomiasis stellt weltweit die bedeutendste Wurmerkrankung dar und ist über weite tropische und subtropische Gebiete verbreitet. Derzeit leben ca. 700 Millionen Menschen in Endemiegebieten von derzeit 76 Ländern (Steinmann et al., 2006). Betroffen ist vor allem der afrikanische Kontinent, während die Schistosomiasis in Lateinamerika und Asien durch effektive Bekämpfungsmassnahmen wesentlich zurückgedrängt werden konnte. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt die Zahl der Infizierten auf mehr als 207 Millionen, von denen ca. 120 Millionen erkranken und davon wiederum 20 Millionen mit schwerwiegenden Folgen (WHO 2010). Todesfälle beruhen vorwiegend auf dem Blasenkarzinom bei der urogenitalen und auf der hepatolienalen Erkrankung bei der intestinalen Schistosomiasis. Aufgrund Fall-spezifischer Todesfallmeldungen schätzte die WHO die Zahl der Todesfälle im Jahr 2004 auf 41.000 (WHO 2010). Analysen der Beziehung zwischen Schistosomiasis und spezifischer Morbidität ergaben für das subsaharische Afrika jedoch, dass die Zahl der Todesfälle bis 280.000 pro Jahr betragen könnte (van der Werf et al., 2003).

Die Verbreitung hängt nicht nur vom Vorkommen der artspezifischen Zwischenwirtschnecken und von der Zahl infizierter Menschen ab, sondern vor allem auch vom Ausmass der Gewässerverunreinigung mit menschlichen Fäkalien und von der Kontakthäufigkeit der Bevölkerung mit verseuchtem Wasser (Mahmoud et al., 1990; Mahmoud, 1992; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010). Durch die vielfältigen Kontakte des Menschen mit Wasser (Fischen, Baden, barfüßiges Waten) kommt es zur Erstinfektion im Kindesalter. Im Jugend- und Erwachsenenalter kommt es dann häufig zu Reinfektionen (Cline, 1989; Davis, 1996; Löscher et al., 2000). Ebenfalls von Bedeutung sind die beruflichen, sozialen und kulturellen Faktoren, wie z.B. Wäsche waschen, Baden und religiöse Bräuche in Süßgewässern (Cline, 1989; Richter et al., 2010).

Betroffen ist vornehmlich die in den Endemiegebieten lebende Bevölkerung. Durch den zunehmenden Tourismus sind jedoch heute ebenfalls viele ausländische Reisende der Gefahr ausgesetzt, sich in den entsprechenden Gebieten zu infizieren (Zuidema, 1981; Istre et al., 1984; Cetron et al., 1996; Jelinek et al., 1996; Schneider et al., 1999; Bou et al., 2001; Bierman et al., 2005; Schwartz et al., 2005; Bottieau et al., 2006; Jauréguiberry et al., 2010; Lambertucci et al., 2010; Richter et al., 2010).

## **1.5 Geografische Verbreitung**

### ***Schistosoma haematobium***

*S. haematobium* ist in 54 Ländern endemisch und kommt vor allem in fast allen afrikanischen Ländern, Madagaskar, Mauritius, Sansibar und im Nahen Osten vor. Besonders hoch ist die Prävalenz im Niltal und einigen Gebieten West- und Ostafrikas (Farid, 1989; Davis, 1996; Löscher et al., 2000; Chitsulo et al., 2000; Richter et al., 2010).

Die Zahl der infizierten Menschen wird auf ca. 90 Millionen geschätzt (Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

### ***Schistosoma mansoni***

*S. mansoni* kommt in 52 Ländern vor und ist vor allem in Afrika verbreitet. Die Endemiegebiete entsprechen zum großen Teil denen von *S. haematobium*, das heißt 42 Länder sind koendemisch. Gerade in diesen Ländern kommt es häufig zu Doppelinfektionen. Besonders hoch ist die Prävalenz im Niltal, in Libyen und der arabischen Halbinsel. Ebenfalls betroffen sind die südamerikanische Ostküste und

Teile der Karibik (Cline, 1989; Davis, 1996; Löscher et al., 2000; Chitsulo et al., 2000; Richter et al., 2010).

Weltweit sind ca. 100 Millionen Menschen mit *S. mansoni* infiziert (Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

### ***Schistosoma intercalatum***

*S. intercalatum* tritt vor allem in Zentralafrika, insbesondere in Kamerun, Gabun, Zaire, Republik Kongo, Zentralafrikanische Republik und Sao Tomé auf (Kuntz, 1989; Davis, 1996; Löscher et al., 2000; Chitsulo et al., 2000; Richter et al., 2010).

### ***Schistosoma japonicum***

*S. japonicum* ist auf den ostasiatischen Raum beschränkt. Endemiegebiete finden sich in China, auf den Philippinen, in Japan, Indonesien und Südthailand (Chen et al., 1989; Davis, 1996; Löscher et al., 2000; Chitsulo et al., 2000; Richter et al., 2010).

Derzeit sind ca. 5 Millionen Menschen infiziert (Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

### ***Schistosoma mekongi***

*S. mekongi* kommt vor allem in Laos, Kambodscha und Nordthailand vor (Kuntz, 1989; Davis, 1996; Löscher et al., 2000; Chitsulo et al., 2000; Richter et al., 2010).

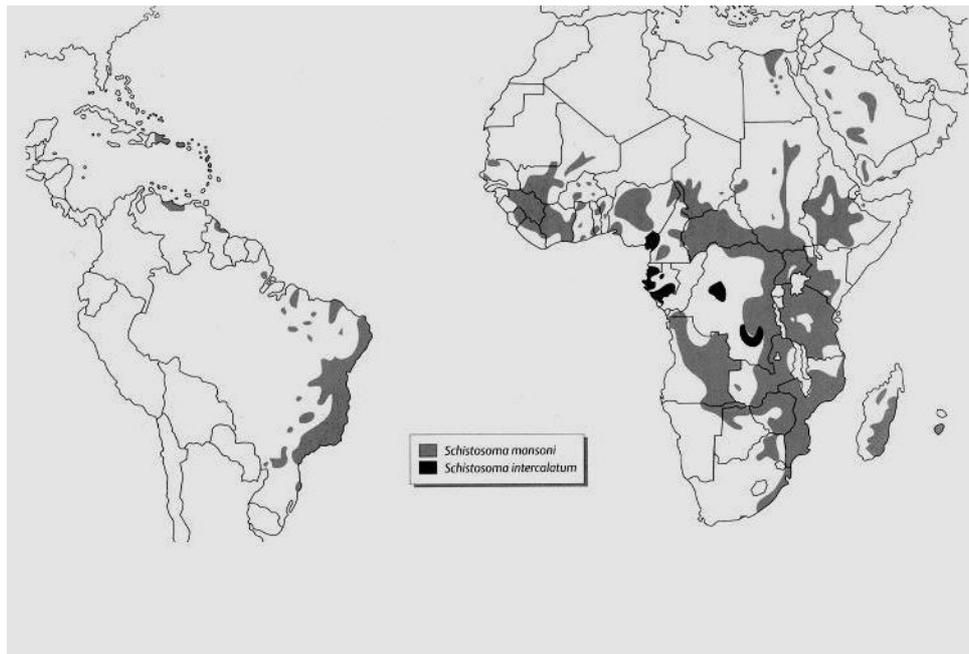


Abbildung 3: Verbreitung von *Schistosoma mansoni* und *Schistosoma intercalatum* nach Löscher et al., 2000

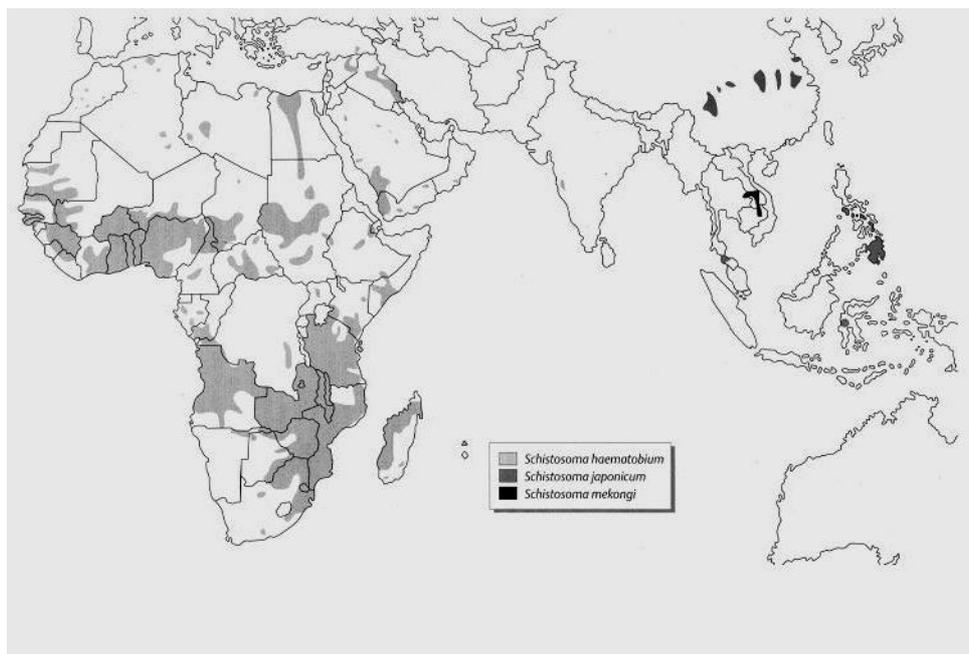


Abbildung 4: Verbreitung von *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum* und *Schistosoma mekongi* nach Löscher et al., 2000

## 1.6 Pathogenese

Nach der Penetration der Zerkarien durch die Haut und der Heranreifeung der adulten Schistosomen wird das Ausmaß der Infektion durch die Anzahl der Wurmpärchen und deren Überlebenszeit bestimmt. Von den vorhandenen adulten Würmern wird in

einem Zeitraum von Jahren eine große Anzahl von Eiern produziert. Diese werden über den Urin oder den Stuhl ausgeschieden. Entscheidend für die Pathogenese der chronischen Schädigung ist allerdings, dass ein Teil der Eier sich in verschiedenen Organen ablagert und somit im Körper verbleibt (Davis, 1996).

Die Pathogenese lässt sich in verschiedene Phasen einteilen (Eckert, 1998)

1. die Penetrationsphase
2. die akute Phase
3. die chronische Phase.

### **1.6.1 Penetrationsphase**

Nach dem Eindringen der Zerkarien in die Haut kommt es zu reaktionslosen Verläufen oder zu einer Hypersensitivitätsreaktion der Haut, der sogenannten Zerkariendermatitis (Osment, 1976; Mahmoud et al., 1990; Mahmoud, 1992; Lambertucci et al., 2010; Richter et al., 2010). Diese ist im Bereich der Eintrittsstelle gekennzeichnet durch Pruritus mit Erythem oder makulopapulösem Exanthem. Hierbei handelt es sich um eine entzündliche Reaktion mit Ödembildung und Infiltration von Neutrophilen, Monozyten und Eosinophilen, die innerhalb weniger Tage wieder abklingt. Diese Hautreaktion tritt vor allem bei Patienten auf, bei denen es zu einer Reinfektion mit derselben Zerkarienart gekommen ist (Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

### **1.6.2 Akute Phase**

Zu einer akuten Phase, in Form einer fieberhaften Allgemeinerkrankung, kann es nach einer Infektion mit einer großen Anzahl von Zerkarien nach einem Zeitraum von etwa 2-10 Wochen kommen. Diese bezeichnet man als das sogenannte Katayama-Syndrom (Mahmoud et al., 1990; Eckert, 1998; Löscher et al., 2000; Jauréguiberry et al., 2010; Richter et al., 2010). Dieses ist gekennzeichnet durch eine Leukozytose mit ausgeprägter Eosinophilie und rasch ansteigenden Antikörperspiegel aufgrund des gleichzeitigen Heranreifens vieler Adulter in der Leber und des Beginns der Ablage einer großen Anzahl von Eiern (Davis, 1996; Löscher et al., 2000; Caldas et al., 2008; Lambertucci et al., 2010; Richter et al., 2010). Aufgrund der Freisetzung von Schistosomen-Antigen kommt es zu einem raschen Anstieg der Antikörper IgM, IgG,

IgE und IgA (Bout et al., 1980; Jassim et al., 1987; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Eckert, 1998; Caldas et al., 2008; Lambertucci et al., 2010).

Im Verlauf der Infektion kann ein zumindest teilweise wirkender immunologischer Schutz vor Re- und Superinfektionen entstehen. Diese Abwehrvorgänge sind vor allem gegen die Schistosomula gerichtet und können das Abtöten eines Großteils der eindringenden Parasiten bewirken. Die Bindung von „blockierenden“ IgM-Antikörpern an Oberflächenantigene von Schistosomula führt allerdings dazu, dass IgE-, IgG<sub>1</sub>- oder IgG<sub>3</sub>-Antikörper nicht mehr an die betreffenden Antigene binden können. Da die Eosinophilen und die Makrophagen keine Fc-Rezeptoren für IgM besitzen und Mastzellen über IgE ihr Zielantigen erkennen, blockiert die IgM-Bindung die zelluläre Abwehr. Somit können nicht in jedem Fall Infektionen wirksam durch das Immunsystem unterdrückt werden (Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010). Beim Menschen scheint in den ersten Jahren der Infektion die Bildung von blockierenden Antikörpern, wie IgM, IgG<sub>2</sub> und IgG<sub>4</sub>, im Vordergrund zu stehen. Im Jugendlichen- und Erwachsenenalter überwiegen die mit Protektion assoziierten Antikörper. Hierzu zählen IgE, IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>3</sub> (Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

Besonders der starke Anstieg des IgM-Antikörpertiters führt zur Bildung zirkulierender Immunkomplexe, welche sich in der Niere ablagern können und somit zu einer Glomerulopathie führen können (Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Eckert, 1998; Richter et al., 2010).

Diese Erscheinungen bestehen einige Tage bis zu mehreren Wochen. Die Eier der Schistosomen werden zu Beginn dieses Stadiums noch nicht ausgeschieden. Bei schwacher Infektion verläuft die Phase in der Regel latent oder subklinisch (Eckert, 1998).

### **1.6.3 Chronische Phase**

Nach etwa 8 Wochen beginnt das Schistosomen-Weibchen mit der Eiablage. Der Anteil der Eier, der über die Darm- oder Blasenschleimhaut ausgeschieden wird, beträgt ca. 50% (Eckert, 1998). Die nicht ausgeschiedenen Eier verbleiben nicht nur in der unmittelbaren Umgebung (Darm- und Blasenschleimhaut) der adulten Würmer, sondern werden mit dem Blutstrom in andere Organe verschleppt. Hierbei kommt es insbesondere zu einer Ablagerung in der Leber und Lunge, seltener im ZNS, der Haut und in anderen Organen (Eckert, 1998; Löscher et al., 2000; Richter et al.,

2010). Jedes Ei bildet den Herd für eine umschriebene granulomatöse Entzündung, der eine zellvermittelte Immunreaktion vom verzögerten Typ zugrunde liegt (Mahmoud et al., 1990; Weinstock, 1992; Davis, 1996; Jauréguiberry et al., 2010; Lambertucci et al., 2010; Richter et al., 2010).

Das im Ei befindliche Mirazidium produziert während seiner 3-4-wöchigen Lebensdauer antigenetisch wirksame Proteine und Glykoproteine, die über Mikroporen der Eischale an die Umgebung abgegeben werden. Diese Ei-Antigene sind löslich und werden auch als soluble egg antigens (SEA) bezeichnet und auch noch nach dem Absterben des Eis sezerniert (Davis, 1996; Eckert, 1998; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010). Nach der Stimulation von T-Lymphozyten entstehen unter Mitwirkung von Zytokinen (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) granulomartige Reaktionsherde, die sogenannten Pseudotuberkel. Die Zytokine haben außerdem einen stimulierenden Effekt auf die Eiablage des Weibchens. Die Granulome stellen ein Infiltrat um das Ei dar, welches sich aus Lymphozyten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Fibroblasten zusammensetzt (Vogel et al., 1975; Mahmoud, 1992; Weinstock, 1992; Davis, 1996; Eckert, 1998; Löscher et al., 2000; Lambertucci et al., 2010; Jauréguiberry et al., 2010; Richter et al., 2010). Diese granulomatösen Herde können konfluieren und Ausgangspunkt größerer granulomatöser Wucherungen sein, die in das Lumen von Blase oder Darm hineinragen (Vogel et al., 1975; Weinstock, 1992; Eckert, 1998). Die in diesem Gewebe eingelagerten Eier sterben innerhalb von 3 Wochen ab und werden abgebaut oder verkalken (Eckert, 1998). Die an der Granulombildung beteiligten Lymphozyten und Makrophagen schütten fibrinogene Zytokine, wie Fibroblasten-stimmulierenden Faktor (FSF I) aus, die eine Einwanderung und Stimulation von Fibroblasten bewirken. Somit kommt es im Laufe der Zeit zu einer bindegewebigen Umwandlung von Gewebeabschnitten im Bereich von Darm und Blase, sowie Lunge, Leber, Milz und anderen Organen (Cline, 1989; Mahmoud et al., 1990; Mahmoud, 1992; Weinstock, 1992; Eckert, 1998; Richter et al., 2010).

## **1.7 Pathologie und Klinik der Schistosomiasis**

Entsprechend der Erregerspezies und der Lokalisation der Hauptveränderung können verschiedene Formen der Schistosomiasis unterschieden werden (Eckert, 1998).

### 1.7.1 Zerkariendermatitis

Das Eindringen der Zerkarien in die Haut kann nach einigen Minuten einen Juckreiz bei den Patienten hervorrufen. Die Zerkariendermatitis wird vor allem durch eine Infektion mit *S. mansoni*, seltener durch *S. japonicum*, hervorgerufen. Besonders bei Patienten, die durch vorangegangene Infektionen sensibilisiert worden sind, kann sich innerhalb weniger Stunden ein erythematöses, makulöses oder papulöses Exanthem (kutane Typ-I-Reaktion) ausbilden. Diese Hautreaktion klingt für gewöhnlich innerhalb weniger Tage wieder ab (Vogel et al., 1975; Osment, 1976; Gonzalez, 1989; Eckert, 1998; Löscher et al., 2000; Lambertucci et al., 2010; Jauréguiberry et al., 2010; Richter et al., 2010).

### 1.7.2 Akute Schistosomiasis (Katayama-Syndrom)

Bei Erstinfektion von ausreichender Stärke folgt der Zerkarieninvasion nach einer Inkubationszeit von 4-6 Wochen für *S. haematobium*, 2-7 Wochen für *S. mansoni* und 2-10 Wochen für *S. japonicum* eine fieberhafte Krankheitsphase (Cline, 1989; Farid, 1989; Chen et al., 1989). Diese wird als eine hyperergische Allgemeinreaktion des sensibilisierten Wirtsorganismus auf Antigene der Wurmlarven gedeutet. In Abhängigkeit vom Krankheitsstadium findet man die Vorstufen der adulten Würmer auch in der Lunge, Leber und selten in anderen Organen (Vogel et al., 1975).

Die häufigsten Symptome sind remittierendes oder intermittierendes Fieber, Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust, Kopf-, Nacken- und Gliederschmerzen, trockener Husten, Urtikaria, angioneurotisches Ödem, Bronchitis, Schmerzen im Oberbauch, Diarrhoe (teilweise blutig) und Schwellung von Leber und Milz (Vogel et al., 1975; Cline, 1989; Eckert, 1998; Lambertucci et al., 2010; Jauréguiberry et al., 2010; Richter et al., 2010). Die Ähnlichkeit des Symptomenbildes mit anderen akuten Infektionserkrankungen führt häufig zu anfänglichen Fehldiagnosen, wie z.B. Trichinose, Grippe, Hepatitis, Brucellose oder Typhus (Vogel et al., 1975; Richter et al., 2010). Diagnostisch wichtig ist das weiße Blutbild, das sich durch eine Leukozytose mit ausgeprägter Eosinophilie und rasch ansteigenden Antikörperspiegel, vor allem der IgM-Klasse, auszeichnet (Vogel et al., 1975; Cline, 1989; Richter et al., 2010). Eine Eiausscheidung ist zu diesem Zeitpunkt meistens noch nicht nachweisbar, während der Antikörnernachweis meist positiv ausfällt. *S. japonicum*-Eier werden frühestens 30 bis 44 Tage nach der Infektion im Stuhl

gefunden, *S. mansoni*-Eier nicht vor Ablauf von 42 Tagen und *S. haematobium*-Eier treten gewöhnlich erst nach 2 ½-3 Monaten im Harn auf (Vogel et al., 1975).

Nach einer Dauer von mehreren Tagen bis Wochen klingt die fieberhafte Initialphase spontan ab und wird vom chronischen Stadium abgelöst (Vogel et al., 1975; Zuidema, 1981; Bou et al., 2001).

### **1.7.3 Urogenitale Schistosomiasis (Blasenbilharziose)**

Die urogenitale Schistosomiasis wird fast ausschließlich durch *Schistosoma haematobium* ausgelöst (Vogel et al., 1975; Mahmoud et al., 1990).

Bei der Schistosomiasis haematobia kann man zwei Stadien unterscheiden, die fließend ineinander übergehen können. Zum einem, vor allem bei jüngeren Patienten, das aktive Stadium, welches mit akuten und subakuten Krankheitserscheinungen, Eiablage in verschiedenen Organen und einer Eiausscheidung über den Urin einhergeht. Zum anderen ein inaktives Stadium bei höheren Altersgruppen. Hier kommt es nur noch zu einer geringen oder fehlenden Eiausscheidung und häufig zu irreversiblen pathologischen Veränderungen (Davis, 1996; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

Die ersten Symptome der Erkrankung treten für gewöhnlich nach 4-6 Wochen auf. Es ist aber ebenso möglich, dass sich die Krankheit erst nach Monaten bis Jahren manifestiert.

Die Beschwerden beginnen zunächst mit Dysurie und einer erhöhten Miktionsfrequenz. Der Harndrang ist häufig gesteigert; Schmerzen sind vor allem im Bereich der Harnröhre, suprapubisch und perineal lokalisiert. Bald darauf oder gleichzeitig tritt eine Hämaturie auf, bei der der Blutabgang in der Regel auf die letzte Harnportion beschränkt ist. Die Makrohämaturie tritt eher inkonstant und intermittierend auf, wobei eine Mikrohämaturie häufig zwischen den einzelnen Episoden nachweisbar ist. Bei einer stärkeren Infektion leiden die Patienten auch häufig an Pollakisurie, Enuresis und Inkontinenz (Vogel et al., 1975; Farid, 1989; Mahmoud et al., 1990; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

Der Harn reagiert, solange bakterielle Sekundärinfektionen fehlen, sauer und im Urinsediment sind wechselnde Mengen von Erythrozyten, Leukozyten und *S. haematobium*-Eiern nachweisbar. Im Verlauf der Erkrankung können kurze oder lange Latenzperioden auftreten, in denen Blut und Eier vorübergehend im Harn fehlen (Vogel et al., 1975; Richter et al., 2010).

Am zystoskopischen Bild fällt als häufigste und früheste Veränderung eine Hyperämie der Schleimhaut mit oder ohne petechiale Hämorrhagien auf. Mit zunehmender Akkumulation der Eier in der Blasenschleimhaut sind 1-2 mm große, erhabene, helle Knötchen mit einem hyperämischen Randsaum vorzufinden. Diese Knötchen werden als Pseudotuberkel bezeichnet. Diese Veränderungen sind für gewöhnlich im Bereich der Ureterostien und am Trigonum am stärksten ausgeprägt. Bei zunehmender Infektionsdauer entstehen aufgrund zunehmender Fibrosierung der Schleimhaut die sogenannten Sandflecken. Außerdem kann es bei fortbestehender Krankheit zu nodulären und polypoiden Läsionen, Ulzera, Schleimhautblutungen und papillomartigen Wucherungen kommen (Vogel et al., 1975; Farid, 1989; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

Während die vorherrschenden leichten und unkomplizierten Erkrankungen nach einigen Jahren ohne Dauerschädigung abklingen, kann ein starker Befall zu einer fibrösen Verdickung und Erstarrung der Blasenwand führen. Diese ist dann massenhaft mit verkalkten Eiern durchsetzt. Charakteristisch ist die Blasendach-Verkalkung, die nicht selten zufällig bei einer Röntgenuntersuchung des Beckens entdeckt wird (Farid, 1989; Davis, 1996; Richter et al., 2010). Eine unvollständige Harnentleerung, Sekundärinfektionen mit *E. coli* und anderen Bakterien können die Folge sein, aus der sich eine aufsteigende Pyelonephritis sowie eine Pyonephrose und schließlich eine Sepsis entwickeln kann (Vogel et al., 1975; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

Eine weitere ernste Komplikation ist die Erkrankung der Ureteren. Hier kann es in der akuten Phase durch Eigranulome, im chronischen Stadium durch fibröse oder atrophische Veränderung der Ureterwand zu obstruktiven oder funktionellen Beschwerden kommen. Folgen können ein vesikoureteraler Reflux, Stauung und Dilatation des Ureters, Hydronephrose bis hin zur Niereninsuffizienz sein (Vogel et al., 1975; Richter et al., 2010). Eine weitere Komplikation ist die bakterielle Sekundärinfektion, durch die es zu Pyelonephritis, Niereninsuffizienz bis hin zur lebensbedrohlichen Sepsis kommen kann. Chronische Salmonelleninfektionen werden gehäuft beobachtet und gehen häufig mit Bakteriämie und Bakteriurie einher (Farid, 1989; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

In einigen Regionen wird die Infektion mit *S. haematobium* mit dem gehäuftem Auftreten einer Nephrolithiasis in Verbindung gebracht. Es handelt sich meist um Phosphatsteine mit bevorzugter Lokalisation in den Ureteren (Löscher et al., 2000). Eine ernste Komplikation ist das Blasenkarzinom, welches sich im klinischen Bild nicht wesentlich von der urogenitalen Schistosomiasis unterscheidet. Im Vergleich zu sonstigen Blasenkarzinomen (Urothelkarzinom) handelt es sich vorwiegend um ein Plattenepithelkarzinom. Hinweisende Symptome sind Miktionsbeschwerden und Hämaturie. In fortgeschrittenen Stadien ist der Urin durch Eiterbeimischung oft trübe und es kann zur Ausscheidung von nekrotischem Tumormaterial kommen. Im Vergleich zu sonstigen Blasentumoren ist der bilharzioseassoziierte Tumor in der Vielzahl der Fälle im Bereich der Blasenwand und eher selten im Bereich des Trigonum lokalisiert. Auch die lymphatische und hämatogene Metastasierung tritt seltener und später auf (Vogel et al., 1975; Farid, 1989; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Richter et al., 2010).

Eine weitere Folge der Infektion mit allen Schistosomenspezies kann die genitale Schistosomiasis sein, tritt aber bei *S. haematobium* und *S. intercalatum*-Infektionen am häufigsten auf. Bei Männern kommt es zu einer Beteiligung von Hoden, Nebenhoden, Samenblasen oder Prostata. Je nach Lokalisation der Schistosomen-Eier klagen die Patienten über Schmerzen im Unterbauch, perianal oder im Hoden, Dysurie, Ejakulationsstörungen, Hämospemie und Schwellung des Skrotums (Vogel et al., 1975; Farid, 1989; Davis, 1996; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

Bei Frauen sind Eigranulome vor allem im Bereich der Vulva, Vagina und Zervix nachweisbar. Im äußeren Genitalbereich und kolposkopisch kann man häufig Ulzerationen, polypöse und papillomatöse Veränderungen nachweisen. Die Patientinnen klagen über Schmerzen im Unterbauch und Genitalbereich, Menstruationsstörungen oder Schmerzen beim Sexualverkehr. Zu den möglichen Folgen zählen Salpingitis, Tubenobstruktion, vesikovaginale Fisteln, Infertilität, erhöhtes Risiko einer Tubargravidität und Störungen der Schwangerschaft (Vogel et al., 1975; Farid, 1989; Davis, 1996; Leutscher et al., 1997; WHO 1998; Löscher et al., 2000; Poggensee et al., 2001; Richter et al., 2010).

#### **1.7.4 Intestinale Schistosomiasis (Darmbilharziose)**

Die intestinale Schistosomiasis wird durch die Infektion mit *S. mansoni*, *S. japonicum* und seltener durch *S. mekongi* und *S. intercalatum* hervorgerufen. Auch *S.*

*haematobium* befällt neben den Harnorganen häufig das Rektum (Vogel et al., 1975; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

Die ursächlichen Eiablagerungen sitzen bei Infektionen mit *S. mansoni* überwiegend im Dickdarm. Bei einer Infektion mit *S. japonicum* ist der Dünndarm häufig mit befallen (Vogel et al., 1975).

Die klinischen Symptome und Befunde können sich nach wenigen Wochen ausbilden; häufig entwickeln sich diese jedoch auch erst nach Monaten bis Jahren. Leichte Infektionen können symptomlos bleiben, oder sie führen zu uncharakteristischen Beschwerden wie Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust, Obstipation, Flatulenz, blutige Diarrhöen, dyspeptische Beschwerden und abdominelle Schmerzen. Während des akuten Stadiums kann sich bereits ein akutes dysenterisches Krankheitsbild ausbilden. Dies wird durch den Beginn der Eiausscheidung und die anschließende Penetration durch die Darmschleimhaut verursacht (Vogel et al., 1975; Cline, 1989; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996).

Auch im fortgeschrittenen Stadium können uncharakteristische abdominellen Beschwerden und dysenterischen Episoden auftreten. Unter Tenesmen treten weiche oder flüssige Stühle in vermehrter Zahl auf. Häufig kommt es zu Blut- und Schleimauflagerungen (Vogel et al., 1975; Cline, 1989). Diese Erscheinungen werden von krampfartigen abdominellen Schmerzen und leichtem Fieber begleitet und gehen oft mit einer Druckempfindlichkeit im Bereich des Abdomens einher. Aufgrund der Durchfälle, dem enteralen Blut- und Eiweißverlust kommt es bei fortgeschrittenen Krankheitsverläufen zu Anämie, Ödemen und Trommelschlegelfingern. Granulomatöse Läsionen und Wucherungen im Kolon und Rektosigmoid können zu Blutungen, Passagestörungen, Ileus und Invagination führen (Vogel et al., 1975; el-Masry, 1986; Davis, 1996). Bei Infektionen mit *S. mansoni* und *S. japonicum* tritt häufig eine Hepatosplenomegalie auf (Cline, 1989; Mahmoud et al., 1990). Bei anhaltender Infektion besteht die Gefahr, dass sich eine Leberfibrose mit portaler Hypertonie entwickelt (Cline, 1989; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996). Bei der rektoskopischen Untersuchung können in ausgeprägten Fällen eine diffuse Hyperämie, Knötchen, Erosionen oder papillomartige Wucherungen dargestellt werden. Auch können Symptome der chronischen Appendizitis durch Eiherde im Wurmfortsatz vorkommen (Vogel et al., 1975; Al-Kraida et al., 1988; Cline, 1989; Löscher et al., 2000; Schafer et al., 2001; Richter et al., 2010).

### 1.7.5 Hepatolienale Schistosomiasis (Hepatolienale Bilharziose)

Die hepatolienale Bilharziose ist die folgenschwerste und die am häufigsten zum Tode führende Form der Schistosomiasis. Vornehmlich hervorgerufen wird diese durch *S. japonicum*, gefolgt von *S. mansoni* und selten durch *S. haematobium*. Hier kommt es zu einer massiven Infarzierung der Leber mit Eiern (Vogel et al., 1975; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996).

Die Hauptsymptome sind eine Vergrößerung von Leber und Milz und im fortgeschrittenen Stadium Zeichen der portalen Stauung (Vogel et al., 1975; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Richter et al., 2010). Zu Beginn sind Leber und Milz von weicher Konsistenz, mit zunehmender Krankheitsdauer fühlen sie sich eher derb an. Während die Größenzunahme der Leber nach einiger Zeit zum Stillstand kommt oder dieses Organ aufgrund von zirrhotischen Umbauvorgängen schrumpft, nimmt die Splenomegalie in schweren Fällen zu. Der untere Milzpol erreicht häufig Nabelhöhe, kann aber auch bis in das kleine Becken reichen (Vogel et al., 1975; Mahmoud et al., 1990; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

Die massive Vergrößerung von Leber und Milz bedingt im fortgeschrittenen Stadium einen stumpfen Rippenwinkel und eine Vorwölbung des Leibes (Vogel et al., 1975). Weitere Symptome sind zunehmende Körperschwäche, Gewichtsverlust, abdominelle Beschwerden, Muskelatrophie, Blässe von Haut und Schleimhäuten und wechselndes Fieber (Vogel et al., 1975; Richter et al., 2010). Nicht selten entwickeln sich auch Amenorrhö, Infertilität, Libidoverlust und Impotenz (Davis, 1996; Richter et al., 2010). Das Blutbild zeigt eine hypochrome Anämie und eine Leukopenie. Weiterhin ist die Infektionsanfälligkeit erhöht und es werden vermehrt chronische Salmonelleninfektionen mit anhaltendem Fieber, positiver Blutkultur, aber negativer Stuhlkultur nachgewiesen (Mahmoud et al., 1990; Richter et al., 2010). Manifestiert sich die Erkrankung bereits im Kindesalter, so kann sie mit Entwicklungsstörungen, Zwergenwuchs und geistiger Retardierung einhergehen (Vogel et al., 1975; Löscher et al., 2000).

Während leichte Erkrankungen nach Jahren zum Teil auch ohne Behandlung überwunden werden, führen die schweren Formen zu einer Reihe von Komplikationen, die schließlich auch zum Tod führen können. Diese Komplikationen manifestieren sich vor allem in der portalen Hypertonie, mit Aszites, Ödemen, Ösophagus- oder Magenvarizenblutung, mit Hämatemesis und Meläna. Weiterhin

kann es zur Ausbildung von portosystemischen Kollateralen, wie periumbilikaler Varikosis, Caput medusae und Hämorrhoiden kommen (Vogel et al., 1975; Cline, 1989; Mahmoud et al., 1990; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010). Die biochemische Funktion ist trotz fortgeschrittener Erkrankung meist gut erhalten und Zeichen der Leberinsuffizienz wie Ikterus, Leberhautzeichen, Gerinnungsstörungen und Enzephalopathie sind selten (Cline, 1989; Mahmoud et al., 1990; Richter et al., 2010). Die häufigste Todesursache ist die massive Varizenblutung, gefolgt von Leberkoma und Sekundärinfektionen wie Sepsis und Pneumonie (Mahmoud et al., 1990; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

### **1.7.6 Lungenschistosomiasis (Lungenbilharziose)**

Schistosomen-Eier können mit dem Blutstrom aus den Beckenvenen in die Aufzweigungen der Lungenarterien verschleppt werden. Die Lungenschistosomiasis tritt meist nach länger bestehender hepatolienaler Bilharziose auf. Erreger sind vor allem *S. mansoni*, gefolgt von *S. japonicum* und selten *S. haematobium* (Vogel et al., 1975; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010). Bei mäßigem Befall der Lunge treten meist keine klinischen Erscheinungen auf. Bei manchen Patienten kommt es jedoch zu Zeichen von Bronchitis oder Bronchialasthma. Ernste Formen bilden sich aus, wenn bei hepatolienaler Schistosomiasis Eier in großer Zahl durch erweiterte Kollaterale aus der portalen in die pulmonale Zirkulation übergeleitet werden. Massive und anhaltende Ei-Embolien führen durch Veränderungen der Lungenarteriolen zu einer Behinderung des kleinen Kreislaufs (Vogel et al., 1975). Dies führt zu einem Druckanstieg im Truncus pulmonalis, einhergehend mit rascher Ermüdbarkeit, Dyspnoe, Palpitationen und pektanginösen Beschwerden (Mahmoud et al., 1990; Löscher et al., 2000). Bei zunehmender Belastung entwickelt sich eine Rechtsherzbelastung mit Dilatation der Pulmonalarterie, Hypertrophie des rechten Ventrikels und schließlich eine Herzinsuffizienz (Cor pulmonale) (Vogel et al., 1975; Mahmoud et al., 1990; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

### **1.7.7 Schistosomiasis des zentralen Nervensystems**

Die zerebrale Schistosomiasis wird vorwiegend durch *S. japonicum* verursacht und zwar durch Ei-Embolien und Granulombildung im Bereich des zentralen

Nervensystems (ZNS) (Vogel et al., 1975; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Richter et al., 2010).

Klinisch kann sich die Beteiligung des ZNS bereits im fieberhaften Anfangsstadium oder erst Monate bis Jahre nach der Infektion äußern (Vogel et al., 1975). Die häufigsten Symptome sind epileptische Krampfanfälle, fokale motorische und sensible Ausfälle, Hirnnervenstörungen, Hirndruckzeichen und apoplektiforme Bilder (Vogel et al., 1975; Löscher et al., 2000; Lambertucci et al., 2010; Jauréguiberry et al., 2010).

Den Erkrankungen des Rückenmarks liegen in der Regel Infektionen mit *S. mansoni* oder *S. haematobium* zugrunde (Vogel et al., 1975; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Richter et al., 2010). Sie treten unter dem Bild einer akuten oder chronischen Myelitis auf (Vogel et al., 1975). Diese führt zu segmentalen sensiblen und motorischen Ausfällen. Die Patienten klagen über Schmerzen im Lumbalbereich und den unteren Extremitäten. Weiterhin kann es zu sensomotorischen Defiziten, bis hin zu Blasen- und Mastdarmlähmungen kommen (Löscher et al., 2000; Junker et al., 2001; Lambertucci et al., 2010).

## 1.8 Therapie

### 1.8.1 Praziquantel (z.B. Biltricide®)

Praziquantel ist ein Pyrazinoisochinolin-Derivat, das 1972 als Medikament eingeführt wurde. Es ist Mittel der 1. Wahl bei der Behandlung menschenpathogener Bandwürmer. Sein Wirkungsspektrum erfasst auch die Trematoden *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*, *Paragonimus westermani* sowie die Bandwürmer *Taenia saginata* und *Taenia solium* (Cline, 1989; Forth, 1996; Davis, 1996). Praziquantel wird nicht nur für die individuelle Therapie, sondern auch in Massenbehandlungskampagnen in Endemiegebieten eingesetzt. Auf Grund der guten Wirksamkeit und Verträglichkeit kann eine Behandlung bei nur serologisch diagnostizierten oder sehr leichten Infektionen indiziert sein (Richter et al., 2010).

Die Wirkungsweise wird als vermizid bezeichnet, das heißt die Würmer sterben in spastischer Lähmung der Muskulatur, welche durch eine depolarisierende Wirkung an der motorischen Endplatte ausgelöst wird. Dies wird wohl durch einen massiven Kalziumeinstrom auf das Tegument und die Muskulatur ausgelöst. Hierdurch

verlieren die Schistosomen den Halt mit ihren Saugnäpfen am Gefäßendothel und werden aus den Mesenterialvenen in die Lebervenen ausgetrieben. Hinzu kommt eine Schädigung im Tegument, welche zu einer Störung der Permeabilität und der Maskierung mit Wirtsantigenen führt. Dadurch sind die adulten Würmer dem menschlichen Immunsystem ausgesetzt. Die Wirksamkeit gegen Schistosomula und juvenile Würmer ist allerdings gering (Forth, 1996; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

Bei einer Infektion mit *S. haematobium* ist eine Einmaldosis von 40 mg/kg ausreichend (Farid, 1989; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Jauréguiberry et al., 2010, Richter et al., 2010). Bei *S. mansoni* und *S. intercalatum* sollte eine zweifache Dosis von jeweils 20 mg/kg an einem Tag verabreicht werden, da hier eine bessere Wirksamkeit als bei der Einmaldosis erzielt wird (Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010). Bei der Infektion mit *S. japonicum* und *S. mekongi* ist eine Dosierung von drei Mal 20 mg/kg an einem Tag empfehlenswert (Chen et al., 1989; Davis, 1996; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010). Die Heilungsrate liegt zwischen 70 und 100% und die Eiausscheidung wird bei über 90% der Patienten reduziert. Trotz einer erfolgreichen Therapie können jedoch Monate vergehen, bis keine Eier mehr ausgeschieden werden, da sie sich langsam vom Gewebe ablösen. Da Praziquantel eine schlechte Wirkung in den frühen Stadien der Schistosomiasis zeigt, sollte eine Therapie erst 2-3 Monate nach der Infektion durchgeführt oder gegebenenfalls wiederholt werden (Löscher et al., 2000).

Bei Infektionen des zentralen Nervensystem (ZNS) sollte die Therapie mit Steroiden kombiniert werden (Cline, 1989).

Praziquantel hat nur geringe toxische Nebenwirkungen. Die Patienten leiden gelegentlich an Urtikaria, Bauchschmerzen, Kopfschmerzen, Schwindel und Nausea unmittelbar nach der Einnahme, wobei diese Beschwerden dosisabhängig auftreten oder möglicherweise Folge der Abtötung der Parasiten sind. Bei rezenter Infektion mit hoher Parasitenlast kann es durch massive Freisetzung von Wurmantigenen, in Folge der medikamentösen Wirkung, zu einer akuten pseudoallergischen Reaktion mit Fieber und Urtikaria kommen. Hier sollte die Therapie mit Antihistaminika und Kortikosteroiden kombiniert werden. Bei der Behandlung eines ausgeprägten Katayama-Syndroms kann ebenfalls eine Zustandsverschlechterung eintreten. Auch hier kann die Gabe von Kortikosteroiden erforderlich sein. Aufgrund eines „first pass“-Effektes bei der Leberpassage und der hohen Ausscheidungsrate über die

Niere ist bei einer Funktionseinschränkung eine strenge Überwachung der Therapie indiziert. In der Schwangerschaft, vor allem im ersten Trimenon, sollte man Praziquantel nur zurückhaltend einsetzen. Da es zu einem Übertritt in die Muttermilch kommt, sollten die Säuglinge behandlungsbedürftiger Mütter anderweitig ernährt werden (Forth, 1996; Löscher et al., 2000; Jauréguiberry et al., 2010; Richter et al., 2010).

### **1.8.2 Oxamniquin (z.B. Mansil®)**

Oxamniquin ist ein Metabolit von 2-Aminomethyltetrahydrochinolin-Verbindungen. Es ist Mittel der 2. Wahl. Seine therapeutische Wirksamkeit ist vor allem bei Befall mit *S. mansoni* erwiesen (Cline, 1989; Forth, 1996; Davis, 1996). Wirkungslos ist es dagegen gegen *S. haematobium* und *S. japonicum*. In der Regel wird es mit Metrifonat (z.B. Bilarcil®) kombiniert, wenn eine Infektion mit *S. mansoni* und *S. haematobium* vorliegt (Forth, 1996).

Verabreicht wird Oxamniquin in einer einmaligen Tagesdosis von 15 mg/kg. Die Heilungsrate liegt zwischen 70 und 100% und die Eiausscheidung wird bis zu 95-97% reduziert (Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Löscher et al., 2000).

Unerwünschte Nebenwirkungen sind Fieber, Halluzinationen und Auslösung von Krämpfen bei Patienten mit epileptischer Vorgeschichte. Wichtig ist es, den Patienten auf eine Rotverfärbung des Urins hinzuweisen. Oxamniquin ist in der Schwangerschaft kontraindiziert (Forth, 1996; Davis, 1996; Richter et al., 2010).

### **1.8.3 Metrifonat (z.B. Bilarcil®)**

Metrifonat ist nur gegen *S. haematobium* wirksam (Davis, 1996; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010). Es wird im Organismus weitgehend metabolisiert, wobei 2,2-Dichlorvinyl dimethyl phosphat entsteht, welches auch als Insektizid (Cholinesterase-Inhibitor) eingesetzt wird (Forth, 1996; Davis, 1996). Metrifonat wird zurzeit nicht mehr hergestellt. Es wurde in einer oralen Einmaldosis von 7,5 mg/kg gegeben. Diese Behandlung wurde im wöchentlichen Abstand zwei Mal wiederholt. Die Heilungsrate lag zwischen 40 und 90% und die Reduktion der Eiausscheidung bei über 90% (Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010). Es kommt zu keinen schwerwiegenden Nebenwirkungen. Die Patienten

klagen gelegentlich über Schwindel und Übelkeit und in höherer Dosierung über kolikartige Beschwerden (Forth, 1996; Davis, 1996).

#### **1.8.4 Artesunat**

Artesunat, ein von Artemisinine abgeleitetes Derivat, wirkt im Gegensatz zu Praziquantel besonders auf die Schistosomula und juvenilen Schistosomen von *S. japonicum*. Verabreicht wird Artesunat einer Dosierung von 8 Mal 50 mg/Tag über 5 Tage. Die Wirksamkeit liegt bei *S. haematobium* bei unter 50% und konnte in Kombination mit Sulfadoxin und Pyrimethamin, welche aktuell in der Malariatherapie eingesetzt werden, deutlich erhöht werden. In Gebieten mit hohem Reinfektionsrisiko wird Artesunat in Kombination mit Praziquantel eingesetzt. Durch diese Kombination konnte die Eiausscheidung deutlich reduziert werden. Artesunat ist in der Schwangerschaft kontraindiziert (Jauréguiberry et al., 2010; Richter et al., 2010).

### **1.9 Verhütung und Bekämpfung**

In Endemiegebieten sind alle natürlichen oder künstlichen Gewässer (Süßwasser) als potentiell verseucht anzusehen. Hierzu zählen Seen, Flüsse, Sümpfe, Reisfelder und Bewässerungssysteme. Die individuelle Prophylaxe beruht auf der Expositionsprophylaxe, das heißt, dass das Baden, Durchwaten, Trinken oder Waschen in solchen Gewässern vermieden werden sollte (Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010). Möglicherweise mit Zerkarien kontaminiertes Trinkwasser muss abgekocht, chloriert oder durch Filtration dekontaminiert werden (Eckert, 1998; Jauréguiberry et al., 2010; Richter et al., 2010).

Die gezielte medikamentöse Behandlung hat sich als die wichtigste Komponente erfolgreicher Bekämpfungsprogramme in Endemiegebieten erwiesen. Bei hoher Prävalenz in endemischen Regionen kann die medikamentöse Behandlung von hauptsächlich betroffenen Bevölkerungsgruppen, z.B. Schulklassen, effektiv und kostengünstig sein. Hierbei werden auch diejenigen, z.B. Kinder, die sehr viel Kontakt zu Wasser haben, erfasst, die die Hauptmenge an Eiern ausscheiden und somit zu einer weiteren Kontamination von Gewässern führen. Bei diesen sogenannten Massenbehandlungskampagnen werden zwar auch Nichtinfizierte behandelt, dies ist aber ethisch vertretbar, da die heutigen Medikamente keine

wesentlichen Nebenwirkungen haben (Mahmoud, 1992; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

Die Therapie auf Bevölkerungsebene ist heute ein wesentliches Instrument in der Schistosomiasis-Bekämpfung. Hierbei können Morbidität, Infektionsintensität und die Übertragung reduziert werden. Es ist zu beachten, dass die Therapiezyklen in regelmäßigen Abständen wiederholt werden müssen, um Neuinfektionen zu erfassen (Mahmoud, 1992; Eckert, 1998; Chitsulo et al., 2000; Löscher et al., 2000).

Hygienische und organisatorische Maßnahmen, wie z.B. der Bau von Latrinen und die Verbesserung der Wasserversorgung, haben das Ziel, die Ausbreitung von Schistosomen-Eiern bzw. den Kontakt mit verseuchten Gewässern zu reduzieren. Die Anwendung von Molluskiziden zur Schneckenbekämpfung wird heute in der Regel nur als zusätzliche Maßnahme zur Reduktion bestimmter Übertragungsherde eingesetzt. Die Bekämpfung der Schnecken mit chemischen Mitteln ist vor allem auch aus ökologischen Gründen sehr in den Hintergrund getreten (Eckert, 1998; Löscher et al., 2000; Chitsulo et al., 2000; Richter et al., 2010).

## **1.10 Diagnostik**

### **1.10.1 Allgemeine Laboruntersuchungen**

Während der akuten Schistosomiasis lässt sich bei 10-70% der Patienten eine Bluteosinophilie nachweisen. Diese geht häufig mit einer Leukozytose (10.000-30.000/ $\mu$ l) und einer starken Beschleunigung der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) einher, wobei insbesondere das Serum-IgM und weniger ausgeprägt die IgG- und IgE-Konzentration erhöht sind. Serumtransaminasen, alkalische Phosphatase und Lactatdehydrogenase sind nur mäßig erhöht (Löscher et al., 2000; Jauréguiberry et al., 2010; Richter et al., 2010).

Im chronischen Stadium, bei Patienten ohne Krankheitserscheinungen, sind die hämatologischen und biochemischen Laborparameter meist unauffällig (Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

Im fortgeschrittenen Stadium der urogenitalen, sowie der intestinalen Schistosomiasis findet sich häufig eine Anämie, die BSG ist leicht beschleunigt und Serum-IgG und -IgM (unspezifisch) sind deutlich erhöht. Zusätzlich kommt es bei der hepato-lienenalen Ausprägungsform häufig zu einer Leukopenie, Thrombopenie, Verringerung der Cholinesterase, Hypoalbuminämie, Hypergammaglobulinämie,

Erhöhung der alkalischen Phosphatase und der Serumtransaminasen. Bis auf die dekompenzierte hepatolienale Schistosomiasis ist der Bilirubinspiegel in der Regel im Normbereich (Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010).

Eine Proteinurie ist meist auch bei der asymptomatischen Blasenbilharziose nachzuweisen, während diese bei der intestinalen Form immer an eine Glomerulopathie denken lassen muss. Mit Hilfe von Fertigreagens-Teststreifen lässt sich häufig auch eine Mikrohämaturie nachweisen. Bei den schweren Formen der Schistosomiasis ist auch immer auf einen Anstieg der renalen Retentionswerte zu achten, da dieser bezüglich der Prognose eher als ungünstig zu werten ist (Löscher et al., 2000).

### **1.10.2 Bildgebende Diagnostik**

Die sonographische Diagnostik bewährt sich bei der Blasenbilharziose und der intestinalen Schistosomiasis als aussagekräftige, feldtaugliche und nicht invasive Methode zur Stadieneinteilung und Verlaufskontrolle nach Therapiebeginn (Mahmoud et al., 1990; Abdel-Wahab et al., 1992; Wiest, 1996; Davis, 1996; Richter et al., 2010). Zum Nachweis von Veränderungen im Bereich der Ureteren sind radiologische Untersuchungsmethoden angezeigt, wie die Urographie, das Computertomogramm (CT) oder das Kernspintomogramm (MRT). Um eine Zystitis, Blasenulzera und das Blasenkarzinom diagnostizieren zu können, muss man sich in den meisten Fällen der Zystoskopie bedienen (Cline, 1989; Davis, 1996). Radiologische Aufnahmen haben sich beim Nachweis von Blasenverkalkungen sensitiver als die Sonographie erwiesen. Diese sind aber selten erforderlich, da sie weniger Aufschluss über Veränderungen der Blasenwand, im Vergleich zur Sonographie, geben (Richter et al., 2010).

Der Nachweis einer ZNS-Beteiligung gelingt mittels CT oder MRT, wobei einzelne oder multiple Läsionen dargestellt werden können (Davis, 1996; Junker et al., 2001; Richter et al., 2010).

### **1.10.3 Mikrobiologische Diagnostik**

Für die mikrobiologische Diagnostik der Schistosomiasis stehen direkte und indirekte Nachweismethoden zur Verfügung (Bergquist, 1992; Davis, 1996). Zu den direkten Methoden zählen der Ei-Nachweis im Urin und Stuhl, der Nachweis von Mirazidien

und die mikroskopische Untersuchung von Biopsien. Zu dem indirekten Nachweismethoden zählt man die klinische Untersuchung, bildgebende Verfahren, Laboruntersuchungen und serologische Nachweismethoden (Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; WHO 1998). Die am häufigsten in der Literatur aufgeführten serologischen Methoden sind der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), der Enzyme-linked Immunoelctrotransfer blot (EITB), der Indirekte Fluoreszenz-Test (IFT) und die Indirekte Hämagglutination (IHA).

### **1.10.3.1 Direkte Methoden**

#### **1.10.3.1.1 Einachweis im Urin**

Die Ausscheidung der Schistosomeneier beginnt nach ca. 30-40 Tagen, gelegentlich auch erst nach Monaten (Mahmoud et al., 1990). Die Eiausscheidung ist in den späten Vormittagsstunden, um die Mittagszeit (10-14 Uhr) und nach körperlicher Aktivität am höchsten (Bretzel et al., 2010; Richter et al., 2010). Bei einer hohen Eiausscheidung kann der Nachweis der Eier in der letzten Portion des Spontanurins gelingen (Löscher et al., 2000). Hierzu wird das Sediment, welches durch Zentrifugation oder Sedimentation gewonnen wurde, mikroskopisch durchgemustert. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Menge an ausgeschiedenen Eiern, sollte die Untersuchung mehrfach wiederholt werden (Davis, 1996; Löscher et al., 2000). Alternativ ist auch die Urinfiltration durch einen Membran- oder auch Papierfilter mit einer Porengösse von ca. 12-25 µm möglich mit anschliessender Durch- oder Auflichtmikroskopie (Mehlhorn et al., 1995; Löscher et al., 2000; Bretzel et al., 2010). Gelingt der Einachweis im Spontanurin nicht, sollte der Sammelurin untersucht werden. Dieser sollte in der Zeit zwischen 9 und 16 Uhr gesammelt werden, da in der Mittagszeit die Ausscheidung der Eier am höchsten ist (Löscher et al., 2000). Auch hier wird das gewonnene Sediment oder Membran- bzw. Papierfilter mikroskopisch auf Eier durchgemustert. Wichtig bei der mikroskopischen Beurteilung ist neben der Artdiagnose, ob Eier mit lebenden Mirazidien vorliegen, oder nur nicht vitale Eier mit amorphem, oft schwärzlichen Inhalt (Vogel et al., 1975) bzw. mit Anfärbung in einer Supravitalfärbung mit Trypanblau oder Kongorot (Löscher et al., 2000; Bretzel et al., 2010).

Sehr spärliche Eiausscheidungen werden oft erst mit Hilfe der Mirazidienschlüpfmethode nachgewiesen (siehe unten) (Vogel et al., 1975).

#### **1.10.3.1.2 Einachweis im Stuhl**

In Stuhlproben können Eier, wenn sie zahlreich vorhanden sind, mit Hilfe einfacher Stuhlausstriche nachgewiesen werden. Anderenfalls müssen Anreicherungsverfahren angewendet werden, wie Sedimentationsverfahren. Hier hat sich die Merthiolat-Jod-Formalin- oder die Natriumacetat-Formalin-Konzentrationsmethode bewährt (Cline, 1989; Löscher et al., 2000; Bretzel et al., 2010; Richter et al., 2010).

Unter Feldbedingungen und in einfach ausgestatteten Labors wird häufig der dicke Stuhlausstrich nach Kato-Katz angewendet (Vogel et al., 1975; Teesdale et al., 1976; Cline, 1989; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Löscher et al., 2000; Bretzel et al., 2010; Richter et al., 2010). Diese Methode ist von der WHO empfohlen und als Kit für Felduntersuchungen verfügbar (Löscher et al., 2000; Bretzel et al., 2010). Hierbei wird eine bestimmte Menge an Stuhl (41,7 mg) auf einen Objektträger gegeben, mit einem in Glycerin-Malachitgrün eingeweichten Cellophanstück bedeckt und danach umgedreht auf eine glatte Oberfläche gelegt. Durch das Gewicht des Objektträgers wird die Stuhlprobe gleichmäßig verteilt. Nun kann das Präparat mit einer Vergrößerung von 100-fach mikroskopisch durchgemustert werden (Löscher et al., 2000; Bretzel et al., 2010).

Zum Nachweis vitaler Eier kann auch hier der Mirazidienschlüpfversuch (siehe unten) angewendet werden.

#### **1.10.3.1.3 Nachweis von Mirazidien (Mirazidienschlüpfversuch)**

Zum Nachweis von Mirazidien wendet man den Mirazidienschlüpfversuch an. Hier wird eine Stuhlprobe oder Harnsediment mit Wasser aufgeschwemmt und mehrfach ausgewaschen. Der somit gewonnene Überstand wird anschließend dem Licht ausgesetzt. Nach ca. 1-2 Stunden kommt es zum Ausschlüpfen von Mirazidien, die man im Lupenmikroskop bei 60-facher Vergrößerung gut erkennen kann (Vogel et al., 1975; Löscher et al., 2000; Bretzel et al., 2010).

#### **1.10.3.1.4 Einachweis in Biopsien**

Die Untersuchung von Biopsien der Blasen- und Darmschleimhaut stellt eine gute Ergänzung zu den Urin- und Stuhluntersuchungen dar (Vogel et al., 1975; Cline, 1989; Mahmoud et al., 1990; Davis, 1996; Löscher et al., 2000). Biopsien sind beim

Nachweis leichter Infektionen der parasitologischen Stuhl- und Urinuntersuchung deutlich überlegen (Richter et al., 2010). Allerdings ist hier eine invasive Materialgewinnung nötig. Deshalb sollte die Blasen- und Darmbiopsie, bei begründetem Verdacht nur dann eingesetzt werden, wenn die nichtinvasiven Methoden versagen, oder der Verdacht auf Blasenkarzinom oder Polyposis besteht (Cline, 1989; Mahmoud et al., 1990; Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010). Bei der endoskopischen Materialgewinnung sollten die Probeexcisate im Bereich verdächtiger Schleimhautveränderungen oder an mehreren verschiedenen Stellen entnommen werden (Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010). Histologische Schnittpräparate zeigen oft nur Anschnitte der Eier, so dass eine Identifizierung erschwert sein kann, aber die Unterscheidung von vitalen und avitalen Eiern möglich ist (Löscher et al., 2000; Richter et al., 2010). Neben der histologischen Aufarbeitung der Gewebeproben sollte ein Quetschpräparat angefertigt werden (Löscher et al., 2000). Hierfür werden reiskorngroße Stückchen ungefärbt zwischen zwei stabile Glasplatten gegeben, bis zur Durchsichtigkeit gepresst und anschließend mikroskopisch durchgemustert. Hierbei ist eine Artdifferenzierung gut möglich und lebende und tote Eier sind leicht zu unterscheiden (Vogel et al., 1975; Davis, 1996; Richter et al., 2010).

### **1.10.3.2 Indirekte Methoden**

#### **1.10.3.2.1 Indirekte Hämagglutination (IHA)**

Für den indirekten Hämagglutinations-Test wird an geeignete Trägererythrozyten (z.B. vom Schaf) lösliches Parasitenantigen angelagert. Die mit dem Antigen beladenen Erythrozyten werden mit Patientenserum zusammengebracht. Sind Antikörper im Serum vorhanden, bildet sich eine netzartige Agglutination aus. In geeigneten Sedimentationsgefäßen (z.B. mit Rundboden) kommt es zu einer makroskopisch sichtbaren „Teppichbildung“ und der Test ist positiv. Sind keine entsprechenden Antikörper im Serum vorhanden, bleibt die Vernetzung aus und es bildet sich im Reaktionsgefäß eine Ablagerung am Boden („Knopf“). Der IHA ist negativ (Mehlhorn, 1988).

Der IHA kann innerhalb einer Stunde mit dem bloßen Auge abgelesen werden. Dieser Test kann auch unter den meist einfachen Feldbedingungen in den Endemiegebieten gut als Screening-Verfahren eingesetzt werden (Bergquist, 1992).

#### **1.10.3.2.2 Indirekter Fluoreszenz-Test (IFT)**

Diese Methode kann verwandt werden, um Antikörper gegen korpuskuläre Antigene bzw. Gefrierschnitte von Zerkarien, Eiern oder Adultwürmern zu detektieren. Zunächst bindet der Antikörper des Patienten an ein bekanntes Antigen. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex wird sichtbar gemacht, indem man einen zweiten Fluoreszin-markierten Antikörper gegen Humanimmunglobuline zugibt. Dieser bindet an den Komplex und lässt sich im Fluoreszenzmikroskop nachweisen (Hallmann, 1980).

Beim IFT wird eine relativ teure technische Ausrüstung (Fluoreszenzmikroskop) benötigt. Weiterhin kann der Test nur von speziell geschultem Personal durchgeführt und ausgewertet werden. Desweiteren schließt die Empfindlichkeit der Reagenzien eine Anwendung des Verfahrens unter Feldbedingungen meist aus (Bergquist, 1992).

#### **1.10.3.2.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Beim Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) binden Antikörper an ein bekanntes Antigen. Es bildet sich ein Antigen-Antikörper-Komplex, an den sich ein mit einem Enzym markierter zweiter Antikörper gegen humane Immunglobuline bindet. Dieses Enzym signalisiert nach der Zugabe des Stoffes, den es katalysieren kann (z.B. Peroxidase-Peroxid) und eines Indikators (Farbstoff), dass der Antikörper des Patienten an dem Antigen haftet. Die Konzentration des Antigen-Antikörperkomplexes kann dann photometrisch gemessen werden.

Die in der Literatur aufgeführten ELISA-Methoden zur Diagnostik der Schistosomiasis unterscheiden sich insbesondere durch die Wahl des Antigens bzw. durch die Aufbereitung des Antigens. Als Antigen dienen zum einen die Eier der Schistosomen und zum anderen die adulten Würmer selbst. Weiterhin werden auch in der Blutbahn zirkulierende Bestandteile der Parasiten verwendet. Hierbei kommt es zu deutlichen Unterschieden bezüglich der Sensitivität bzw. der Spezifität.

#### **Circulating anodic antigen (CAA) und Circulating cathodic antigen (CCA)**

Ein häufig verwendetes Antigen ist das „Circulating anodic antigen (CAA)“ und das „Circulating cathodic antigen (CCA)“. Hier handelt es sich um Proteoglykane, welche im Golgi-Apparat, in Vesikeln und im Darmepithel von Schistosomen nachgewiesen

wurden (de Jonge, 1992) und sich zum einen in ihrem Aufbau und zum anderen in der Ladung unterscheiden (van Lieshout et al., 2000).

In einer Studie von de Jonge et al. verwendetes „Circulating anodic antigen (CAA)“ erreicht eine Sensitivität von 75-93% und eine Spezifität von 100% (de Jonge et al., 1988; de Jonge, 1992).

In der Arbeit von Al-Sherbiny et al. wird als Antigen das „Circulating anodic antigen (CAA)“ und das „Circulating cathodic antigen (CCA)“ eingesetzt. Die Autoren haben Serum- und Urinproben von Patienten mit einer gesicherten Infektion mit *S. haematobium* untersucht. Sie haben bei den untersuchten Serumproben eine Sensitivität von 55% (CAA) und bei den Urinproben eine Sensitivität von 78% (CCA) erreicht (Al-Sherbiny et al., 1999).

### **Soluble egg antigen (SEA), Keyhole limpet haemocyanin (KLH), Cationic egg fraction 6 (CEF 6) und 26 kDa recombinant protein (RP26)**

Li et al. verwenden als Antigen lösliche Bestandteile von *S. japonicum*-Eiern (SEA=soluble egg antigen) und „keyhole limpet haemocyanin“ (KLH). Bei dem KLH handelt es sich um ein kohlenhydrathaltiges Epitop von marinen Schlüssellochschnellen (*Megathura crenulata*), welches ebenfalls auf der Oberfläche der Eier, Zerkarien und Schistosomula von *S. mansoni* vorkommt. Es wurden jeweils 50 Seren von akut und chronisch erkrankten Patienten untersucht. Bei den Patienten lag eine gesicherte Infektion mit *S. japonicum* vor. Als Test wurde ein Dot-ELISA verwendet, bei dem im Fall einer positiven Reaktion ein farbiger Punkt auf einem Nitrozellulose-Streifen mit bloßem Auge abgelesen werden kann. Bei den akut Erkrankten wurde mit beiden Antigenen eine Sensitivität von 100% erreicht, während bei den chronisch Erkrankten jeweils eine Sensitivität von 90% erzielt wurde. Ein deutlicher Unterschied zeigte sich in der Spezifität. Mit dem Antigen KLH wurde eine Spezifität für beide Patientengruppen von 100% erreicht, während mit dem SEA-Antigen nur eine Spezifität für beide Gruppen von 86,4% erreicht wurde (Li et al., 1997).

Doenhoff et al. erzielten eine Sensitivität von 94% bis 99% und eine Spezifität von 13% bis 64% bei Serumproben von Patienten mit einer Infektion durch *S. mansoni* und/oder *S. haematobium*. Als Antigen wurde SEA von *S. mansoni* verwendet. Um die Sensitivität und Spezifität zu steigern verwendeten Doenhoff et al. eine Untereinheit von SEA, welche als CEF 6 (Cationic egg fraction 6) bezeichnet wird. Es

gelang, die Sensitivität auf 99% und die Spezifität ebenfalls auf 99% anzuheben (Doenhoff et al., 1993). Dieses wurde von Ghandour et al. nicht bestätigt, da die Sensitivität bei 90% und die Spezifität bei nur 55% lagen. Getestet wurden Seren von Patienten, die sich mit *S. mansoni* infiziert haben (Ghandour et al., 1997).

Alarcón de Noya et al. untersuchten 94 Seren von Patienten, die mit *S. mansoni* infiziert waren und erzielten mit SEA (*S. mansoni*) eine Sensitivität von 99%. Die Spezifität lag bei 71-74%. Um die Spezifität anzuheben, versetzten sie das SEA-Antigen mit Natriummetaperjodat (sodium metaperiodate, SMP). Die Sensitivität blieb unvermindert bei 99%, während die Spezifität auf ebenfalls 99% angehoben werden konnte (Alarcón de Noya et al., 2000).

Die Arbeitsgruppe von Zhu et al. verwendete SEA-Antigen von *S. japonicum* und untersuchte die Seren von Patienten, die akut bzw. chronisch mit *S. japonicum* infiziert waren. Im ELISA erreichte sie eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 96,7%. In dem schneller und einfacher durchzuführenden dipstick dye immunoassay (DDIA) lag die Sensitivität bei den akut erkrankten Patienten bei 96,7% und bei den chronisch Erkrankten bei 94,1%. Beim dipstick dye immunoassay (DDIA) werden Nitrozellulose-Streifen mit IgG-Antikörper beschichtet, der gegen menschliche Antikörper gerichtet sind. Das Patientenserum wird mit Antigen (SEA) gemischt und anschließend wird der Nitrozellulose-Streifen für einige Minuten eingetaucht. Im Fall einer positiven Reaktion kann eine Bande abgelesen werden (Zhu et al., 2002).

Makarova et al. verwendeten als Antigen im ELISA rekombinante Proteine (26 kDa recombinant protein (RP26)) von *Schistosoma mansoni*. Bei der Gruppe von akut erkrankten Patienten erreichten sie eine Sensitivität von 89%. Bei den Seren der Patientengruppe mit einer chronischen Schistosomiasis wurde jedoch nur eine Sensitivität von 26% erzielt (Makarova et al., 2003).

### **Mikrosomales Antigen (MAMA, HAMA und JAMA)**

Tsang et al. verwendeten als Antigen das endoplasmatische Retikulum von adulten *S. mansoni* bzw. *S. haematobium* und *S. japonicum*. Nach verschiedenen Fraktionierungsschritten wird von den adulten Würmern die mikrosomale Fraktion gewonnen, die die höchste spezifische Aktivität zeigt. Tsang et al. bezeichneten diese Fraktion als mikrosomales Antigen. Je nach Spezies verwenden sie *Schistosoma mansoni* mikrosomales Antigen (MAMA), *Schistosoma haematobium*

mikrosomales Antigen (HAMA) und *Schistosoma japonicum* mikrosomales Antigen (JAMA) (Tsang et al., 1983). In der Untersuchung stellte sich heraus, dass die Kreuzreaktionen mit *Trichinella spiralis*, *Paragonimus westermani* und *Clonorchis sinensis* im Vergleich zum ELISA mit SEA als Antigen deutlich geringer sind (Tsang et al., 1983).

In der Untersuchung von Maddison et al. wurden Seren von Patienten, bei denen eine Infektion durch *S. mansoni* vorlag, getestet. Als Antigen wurde MAMA verwendet. Die Sensitivität lag bei 96% und die Spezifität bei 99%. Bei der Untersuchung von Seren von Patienten, die sich durch heterologe Schistosomenarten (*S. haematobium* und *S. japonicum*) infiziert hatten, lag die Sensitivität jedoch nur bei 55% (Maddison et al., 1985).

Tsang et al. führen in einer weiteren Arbeit einen FAST<sup>®</sup>-ELISA mit MAMA als Antigen auf. Die Seren stammten von Patienten mit einer *S. mansoni*-Infektion. Hier lag die Sensitivität und Spezifität sogar bei 99% (Tsang et al., 1997). Dieser ELISA basiert auf dem Falcon Assay Screening Test<sup>®</sup>-System (FAST<sup>®</sup>-ELISA). Hierbei handelt es sich um Polystyrol-Kügelchen, die an einem kurzen Stäbchen angebracht sind. Die Kügelchen werden mit Antigen beschichtet und anschließend in verdünntes Patientenserum (PBS/Tween) gegeben. Nun können eventuell vorhandene Antikörper binden, die dann in weiteren Schritten nach Zugabe eines Indikators (Farbstoff) sichtbar gemacht werden. Eine positive Reaktion kann mit bloßem Auge oder mit Hilfe eines Photometers abgelesen werden (Tsang et al., 1997).

#### **1.10.3.2.4 Enzyme-linked Immunoelctrotransfer blot (EITB)**

Beim Enzyme-linked Immunoelctrotransfer blot (EITB) wird zunächst das Antigen über ein Gradientengel aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose übertragen. In einem weiteren Schritt können Antikörper aus Patientenseren an das Antigen binden, die dann mittels eines Enzym-markiertem Anti-Humanimmunglobulins farblich dargestellt werden (Tsang et al., 1983).

#### **SM 31/32**

Idris et al. verwendeten als Antigen SM 31/32. Hierbei handelt es sich um eine Fraktion von löslichem Antigen von adulten *S. mansoni* mit einem Molekulargewicht von 31-32 Kilodalton (kDa). Die Sensitivität und Spezifität liegt bei diesem Nachweisverfahren bei 99% (Idris et al., 1988).

### **Soluble egg antigen (SEA)**

Alarcón de Noya et al. haben einen EITB mit SEA (soluble egg antigen) durchgeführt. Die diagnostischen Banden lagen in einem Bereich von 14-161 kDa. Ebenfalls wie bei dem ELISA haben Alarcón de Noya et al. das SEA-Antigen mit Natriummetaperjodat (sodium metaperiodate, SMP) behandelt. Die diagnostischen Banden liegen in einem Bereich von 16-139 kDa. Über die Sensitivität und Spezifität wurden keine Aussagen gemacht (Alarcón de Noya et al., 2000).

Valli et al. verwendeten für den EITB lösliches Antigen von adulten *S. mansoni*. Die diagnostischen Banden lagen in einem Bereich von 30-32 kDa (Valli et al., 1999).

### **Soluble Schistosoma mansoni adult worm antigen preparation (SWAP)**

Tawfeek et al. verwenden als Antigen soluble Schistosoma mansoni adult worm antigen preparation (SWAP). Es handelt es sich um eine Fraktion von löslichem Antigen von adulten *S. mansoni*. Die diagnostischen Banden liegen bei Serumproben von akut erkrankten Patienten in einem Bereich von >116, 84, 48, 40 und 34 kDa und bei Proben von chronisch erkrankten Patienten im Bereich von 80, 70, 42, 36, 30 und 26 kDa. Die Bande 34 kDa zeigt bei den Proben der akut Erkrankten eine hohe Sensitivität (96%) und hohe Spezifität (100%) (Tawfeek et al., 2004).

### **Mikrosomales Antigen (MAMA, HAMA und JAMA)**

Tsang et al. verwendeten für den EITB die mikrosomale Fraktion MAMA (*S. mansoni*) und JAMA (*S. japonicum*) als Antigen. Für das MAMA-Antigen werden diagnostische Banden im Bereich von 16-29 kDa und größer als 40 kDa beschrieben. Hier werden drei Banden besonders hervorgehoben. Im Bereich von 18,4 kDa, 16,4 kDa und 29,0 kDa. Für das JAMA-Antigen schränken sie den diagnostischen Bereich zwischen 18 und 35 kDa und größer als 40 kDa ein. Tsang et al. heben hier drei Banden im Einzelnen hervor. Diese liegen im Bereich von 34,3-30,4 kDa, 27,6-24,7 kDa und 19,6-18,1 kDa (Tsang et al., 1984).

Tsang et al. veröffentlichten 1997 eine Studie, in der als Antigene die mikrosomalen Fraktionen MAMA (*S. mansoni*), HAMA (*S. haematobium*) und JAMA (*S. japonicum*) verwendet wurden. Zur Austestung standen jeweils homologe Patientenseren, Seren mit anderen Helminthosen und Negativkontrollen zur Verfügung. Als spezifische Banden werden für MAMA 30 kDa, für HAMA 23 kDa und für JAMA 18, 23 und 29

kDa angegeben. Die Sensitivität betrug jeweils 97% und die Spezifität wurde mit 100% angegeben (Tsang et al., 1997).

#### **1.10.4 Probleme der Diagnostik**

Trotz der hohen Sensitivitäts- und Spezifitätsraten der zur Verfügung stehenden Nachweismethoden, wie zum Beispiel der Einachweis im Stuhl oder Urin und serologischer Testverfahren, werden nicht alle Schistosomiasen erfasst.

Traditionell basiert die Diagnose der Schistosomiasis auf dem Nachweis von Eiern im Stuhl oder Urin. Diese Form der Diagnostik ist jedoch limitiert, da nicht alle Patienten Eier ausscheiden, oder diese sehr unregelmäßig ausscheiden. Weiterhin kann es auch nach einer erfolgreichen Therapie zur weiteren Eiausscheidung kommen.

##### **1.10.4.1 Antikörpernachweis**

Die einzelnen serologischen Nachweismethoden, bei denen Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen nachgewiesen werden können, sind sehr sensitiv und spezifisch. Aufgrund der langen Persistenz der Antikörpertiter lässt sich jedoch eine akute von einer chronischen Infektion nicht unterscheiden (Wilson et al., 1974; Tsang et al., 1997; Abou-Basha et al., 2002; Caldas et al., 2008). Die Unterscheidung zwischen akuter und chronischer Erkrankung über die Antikörpertiter (IgM, IgA und IgG) gelingt nur in Kombination verschiedener serologischer Testsysteme (ELISA) mit verschiedenen Antigenen wie z.B. soluble egg antigen (SEA), soluble worm adult protein (SWAP) und keyhole limpet hole (KLH) (Beck et al., 2004; Beck et al., 2008). Weiterhin besteht die Problematik, dass nach einer medikamentösen Behandlung ein Erfolg oder Misserfolg serologisch nicht dargestellt werden kann (Tsang et al., 1997; Richter et al., 2010).

##### **1.10.4.2 Antigennachweis**

Li et al. untersuchten in ihrer Arbeit Seren von Patienten mit einer Infektion durch *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum* und *S. intercalatum*. Als diagnostischen Test verwendeten sie einen ELISA. In den Patientenseren wurden zirkulierende Proteinbestandteile (31/32 kDa) von *S. mansoni* nachgewiesen. Die Sensitivität unterscheidet sich deutlich innerhalb der verschiedenen Schistosomen-Spezies. So

ist die Sensitivität bei *S. haematobium* 100%, bei *S. intercalatum* 94%, bei *S. japonicum* 88% und bei *S. mansoni* 80% (Li et al., 1996).

Deelder et al. und de Jonge et al. verwendeten den ELISA zum Nachweis von Circulating anodic antigen (CAA) im Serum. Im Serum zeigten die positiven Ergebnisse eine Korrelation zur Menge an ausgeschiedenen Eiern. Es wurden Seren erfasst, mit weniger als 1 ng CAA pro ml Serum. Allerdings liegt die Sensitivität bei Patienten mit einer Ei-Ausscheidung von 1-100 Eiern/g (Stuhl), bei lediglich 60-70% (de Jonge et al., 1982; Deelder et al., 1989; Tsang et al., 1997).

Van Lieshout et al. wendeten den ELISA zum Nachweis von Circulating anodic antigen (CAA) im Urin an. Hier korrelieren die Ergebnisse ebenfalls mit der Anzahl der ausgeschiedenen Eier. Hier stellt sich das Problem, dass der Test allerdings erst nach einem Zeitraum von ca. sechs Wochen post infectionem reagiert (van Lieshout et al., 1991; Tsang et al., 1997).

Idris et al. verwendeten als serologisches Testverfahren den EITB. Als Antigen verwendeten sie SM 31/32. Hierbei handelt es sich um eine Fraktion von löslichem Antigen von adulten *S. mansoni* mit einem Molekulargewicht von 31-32 kDa. Die Sensitivität und Spezifität liegt bei 99%. Hier liegt der Nachteil jedoch im hohen technischen Aufwand, so dass der Test nicht für Massenuntersuchungen eingesetzt werden kann (Idris et al., 1988; Tsang et al., 1997).

#### **1.10.4.3 Molekularbiologische Diagnostik**

Verschiedene PCR-Methoden zum Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte der Eier von *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* und *S. japonicum* im Stuhl bzw. im Urin sind beschrieben und zum Teil für die Diagnostik und für epidemiologische Untersuchungen eingesetzt worden (Pontes et al., 2003; Lier et al., 2006; ten Hove et al., 2008; Richter et al., 2010). Diese Methoden erlauben jedoch keine Beurteilung der Ei-Vitalität. Zudem erwiesen sie sich in einigen Untersuchungen nicht als sensitiver im Vergleich zur parasitologischen Diagnostik (Einachweis mittels Anreicherungsverfahren).

Vor kurzem wurde der Nachweis Zell-freier Schistosomen DNA im Plasma von Patienten mit akuter Schistosomiasis (Katayama-Syndrom) beschrieben (Wichmann et al., 2009).

PCR-Nachweise in Stuhl- und Urinproben wurden bisher nur in wissenschaftlichen Studien angewandt. Für die diagnostische Routine stehen diese Methoden derzeit

nicht zur Verfügung und die Validierung für die Diagnostik steht noch aus (Richter et al., 2010).

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Während der mehrere Wochen bis mehrere Monate dauernden Präpatenzzeit ist der Antikörpernachweis oft der einzige Laborbefund für die Untermauerung der Diagnose Schistosomiasis.

Allerdings hat die Immundiagnostik der Schistosomiasis Schwachpunkte:

- Eine zu geringe Sensitivität
- Kreuzreaktionen mit Antikörpern, die gegen andere Trematoden oder zum Beispiel gegen *Trichinella spiralis* oder Filarien gerichtet sind (geringe Spezifität)
- Der Antikörpertiter bleibt auch nach einer erfolgreichen medikamentösen Behandlung lange nachweisbar
- Keine Korrelation zwischen Titer und Befallsintensität bzw. Morbidität

Auch nach Ablauf der Präpatenzzeit kann der direkte Nachweis der Eier im Stuhl oder Urin problematisch sein. Einerseits gilt dies für alle geringgradigen Infektionen, andererseits scheiden nicht alle Patienten mit stärkerer Infektionslast Eier aus oder die Phasen der Ei-Ausscheidung verlaufen sehr unregelmäßig. Weiterhin ist zu beachten, dass die Patienten trotz einer erfolgreichen Therapie die Schistosomen-Eier noch für Monate weiter ausscheiden können.

Wie in der Einleitung ausgeführt, gibt es eine Reihe an direkten und indirekten Nachweisverfahren. Gerade in der Immundiagnostik wurden zahlreiche Testsysteme mit unterschiedlichem Antigen angewendet.

Tsang et al. haben als Antigen die mikrosomale Fraktion der Schistosomen isoliert. Die mikrosomale Fraktion ist eine Anreicherung des endoplasmatischen Retikulums. Dieses wird durch die Homogenisierung der Zelle freigesetzt und erfährt eine physikalische Veränderung in seiner Struktur. Aus den Cysternae werden durch die mechanische Disruption 0,1 µm große geschlossene Vesikel, die als Mikrosomen bezeichnet werden. Die membrangebundenen Glykoproteine werden durch die Behandlung mit Urea freigesetzt und für die Beschichtung von Polystyrolflächen geeignet gemacht (Tsang et al., 1983).

Die mikrosomale Fraktion der adulten Würmer wurde als besonders geeignetes Antigen für die Frühdiagnose und für die Beurteilung im Therapieverlauf bei der experimentellen Schistosomiasis beschrieben (Tsang et al., 1983).

Demgegenüber sind Antikörper gegen das meist für die Immundiagnostik verwendete lösliche Eiantigen (SEA, soluble egg antigen) eher im chronischen Infektionsstadium nachzuweisen und persistieren auch nach erfolgreicher Therapie langfristig.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob sich die Immundiagnostik der Schistosomiasis durch die Anwendung der mikrosomalen Fraktion der Adultwürmer als Antigen verbessern lässt. Dies sollte vor dem Hintergrund evaluiert werden, dass sich das Patientengut der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität zum einen aus Patienten zusammensetzt, welche sich im Rahmen eines Urlaubs oder beruflich in den Endemiegebieten aufgehalten und infiziert haben. Hier ist aufgrund der Anamnese von einer frischen Infektion mit Schistosomen auszugehen. Auf der anderen Seite sollten Schistosomiasis-Patienten untersucht werden, die nach Deutschland eingereist bzw. eingewandert sind und aufgrund ihrer geographischen Herkunft schon frühen Kontakt zu den dort heimischen Parasiten hatten.

Im Folgenden die Fragestellung im Einzelnen:

- 1) Wie hoch ist die Sensitivität und Spezifität des *Schistosoma mansoni* mikrosomalen Antigens (MAMA) im Vergleich zum Ei-Antigen (SEA)?
- 2) Ist MAMA ein Kandidat für die Speziesbestimmung innerhalb des Genus?
- 3) Wie hoch ist die Spezifität in Bezug auf andere Helminthiasen im Vergleich zum Ei-Antigen?
- 4) Ist es möglich, einen frühen Anstieg bzw. einen Abfall des Antikörper-Titers zum Beispiel nach Behandlung nachzuweisen und kann man dieses eventuell für den Therapieverlauf nutzen?
- 5) Wie viel Rohmaterial (adulte Schistosomen) ist nötig, um eine sinnvolle Menge an MAMA herzustellen?

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Serumproben**

##### **3.1.1 Serumproben mit nachgewiesener Schistosomeninfektion**

Für die Austestung des Antigens standen uns 84 Serumproben von 30 Patienten zur Verfügung, die in einem Zeitraum von 1989 bis 1999 in der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität abgenommen wurden. Bei allen Patienten lag eine gesicherte Schistosomeninfektion vor, das heißt, dass die Eier von *S. mansoni* oder *S. haematobium* im Stuhl, Urin oder Biopsiematerial nachgewiesen werden konnten. Des Weiteren wurden die Anamnese, der körperliche Untersuchungsbefund und die serologischen Laborbefunde in die Patientenauswahl einbezogen. Mit Hilfe der Anamnese konnten wir vor allem bei den deutschen Patienten den Expositionszeitraum eingrenzen. Wir haben die Patienten in zwei Gruppen aufgeteilt; zum einen deutsche Patienten und zum anderen Patienten, deren Herkunftsland zu einem Hyperendemiegebiet zählt.

Dies wurde nötig, da es bei den Patienten aus einem Hyperendemiegebiet aufgrund ihres Herkunftslandes zu einer Infektion bereits im Kinder- oder Jugendalter gekommen sein könnte und somit der Expositionszeitraum zwischen Jahren und Jahrzehnten lag.

Die deutschen Patienten haben wir in zwei Gruppen aufgeteilt, wobei bei der ersten Gruppe der Infektionszeitpunkt innerhalb von sechs Monaten bis zur ersten Blutabnahme lag und bei der zweiten Gruppe der mögliche Infektionszeitpunkt mehr als sechs Monate zurücklag.

Uns standen pro Patient eine unterschiedliche Anzahl von Serumproben zur Verfügung. Um möglichst vergleichbare Bedingungen zu schaffen, haben wir bei jedem Patienten jenes Serum genommen, welches mit dem Einachweis im nächsten zeitlichen Zusammenhang stand. Die Patienten wurden wie folgt eingeteilt:

- Proben von deutschen Patienten, die in einem Zeitraum von sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden n = 7
- Proben von deutschen Patienten, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden n = 6
- Proben von Patienten aus Endemiegebieten, bei denen die Blutabnahme in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion erfolgte n = 17

### 3.1.2 Serumproben mit nachgewiesenen anderen Helminthosen

Zur Austestung des Antigens auf Kreuzreaktionen standen uns 231 Seren von Patienten zur Verfügung, bei denen eine gesicherte Infektion mit anderen Helminthen vorlag. Hierbei handelte es sich ebenfalls um Serumproben aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität. Hierbei stand uns pro Patient jeweils ein Serum zur Verfügung. Die einzelnen Erregerarten und die Anzahl der Patientenseren sind nachfolgend aufgeführt.

- *Ancylostoma duodenale* n = 47
- *Ascaris lumbricoides* n = 16
- *Echinococcus granulosus* (zystische Echinokokkose) n = 20
- *Echinococcus multilocularis* (alveoläre Echinokokkose) n = 32
- *Onchocerca volvulus* n = 15
- *Strongyloides stercoralis* n = 27
- *Taenia solium* (Zystizerkose) n = 13
- *Trichinella spiralis* n = 29
- *Trichuris trichiura* n = 32

Um auch bei diesen Patienten eine frühe Infektion mit Schistosomen im Kindes- oder Jugendalter weitgehend ausschließen zu können, haben wir diese Patienten ebenfalls in zwei Gruppen eingeteilt. Zum einen Patienten aus Herkunftsländern, die keine Endemiegebiete der Schistosomiasis sind und zum anderen Patienten, bei denen es aufgrund ihres Herkunftslandes zum Kontakt mit Schistosomen gekommen sein könnte.

Die Anzahl der Seren von Patienten aus Herkunftsländern, die keine Endemiegebiete sind mit einer gesicherten Helminthose beträgt 100. Die Verteilung ist im Einzelnen:

- *Ancylostoma duodenale* n = 17
- *Ascaris lumbricoides* n = 3
- *Echinococcus granulosus* n = 3
- *Echinococcus multilocularis* n = 32
- *Onchocerca volvulus* n = 9
- *Strongyloides stercoralis* n = 8
- *Taenia solium* n = 1
- *Trichinella spiralis* n = 22
- *Trichuris trichiura* n = 5

Bei den Seren von Patienten aus Endemiegebieten standen uns 131 zur Verfügung.

Diese teilen sich folgendermaßen auf:

- *Ancylostoma duodenale* n = 30
- *Ascaris lumbricoides* n = 13
- *Echinococcus granulosus* n = 17
- *Onchocerca volvulus* n = 6
- *Strongyloides stercoralis* n = 19
- *Taenia solium* n = 12
- *Trichinella spiralis* n = 7
- *Trichuris trichiura* n = 27

### 3.1.3 Negativkontrolle

Als Negativkontrolle dienten uns 142 Seren von Blutspendern des Bayerischen Roten Kreuzes München, die in der Vorgeschichte keine Aufenthalte in Endemiegebieten angaben.

## 3.2 Antigen

### 3.2.1 Antigengewinnung für die mikrosomale Fraktion (Tsang et al., 1983)

Zur Herstellung wurden adulte *S. mansoni* aus dem Mesenterium infizierter Mäuse (Fa. Charles River Deutschland, NMRI ♀♀) verwendet. Um diese zu züchten, wurde der Lebenszyklus von *S. mansoni* unter Laborbedingungen nachgestellt.

Hierzu wurden zunächst die Leber und der Darm aus infizierten Mäusen entnommen, von Kot gereinigt und zerkleinert. Um sicher zu gehen, dass eine ausreichende Infektion der Maus vorlag haben wir von reiskorngroßen Gewebestücken ein Quetschpräparat angefertigt und dieses mikroskopisch auf vitale Eier durchgemustert. Das zerkleinerte Gewebe wurde dann in 28°C bis 30°C warmes, entkalktes Wasser (pH 7,6) gegeben und unter einen 100 Watt Strahler (ca. 5000 Lux) platziert. Die Mirazidien, die positiv phototrop und negativ geotaktisch sind, reicherten sich nach ein bis zwei Stunden in den oberen Wasserschichten an. Nach der Entnahme der Mirazidien wurden diese für 12 Stunden zu Süßwasserschnecken (*Biomphalaria glabrata*) gegeben. In den ersten vier Wochen wurden die Schnecken unter Tageslichtbedingungen gehalten. In den darauffolgenden Wochen hielten wir die Schnecken unter abgedunkelten Bedingungen, um eine übermäßige Zerkarienausschüttung zu verhindern.

Etwa vier bis sechs Wochen post infectionem konnten wir die Schnecken schütten lassen. Hierfür wurden diese in entkalktes Wasser (pH 7,6) mit einer Temperatur zwischen 28°C und 30°C gegeben. Um die Ausschüttung der Zerkarien unter dem Lupenmikroskop (Fa. Olympus 275205) verfolgen zu können, benutzten wir Multi-Well-Platten (Fa. Sigma Z 37,214-5, 24 Vertiefungen, Ø 1,7 cm) mit einem Durchmesser von 17 mm pro Napf. Nach ca. einer Stunde unter einer 100 Watt Lichtquelle wurden die ausgeschütteten Zerkarien mit einer Pipette aufgenommen und in ein weiteres Gefäß überführt. Dieses wurde wiederum unter einer Lichtquelle platziert. Die positiv phototaktischen Zerkarien reicherten sich nach ca. einer Stunde im Bereich der Wasseroberfläche an. Der aufgenommene Schneckenkot setzte sich am Boden des Gefäßes ab. Danach wurden die Zerkarien entnommen und wiederum in ein neues Gefäß überführt, welches auf 4°C gekühlt wurde. Aufgrund des Temperaturabfalls setzten sich die Zerkarien am Boden des Gefäßes ab und überschüssige Flüssigkeit konnte entfernt werden. Somit erreichten wir eine möglichst hohe Zerkarienkonzentration in einem geringen Flüssigkeitsvolumen. Nach Aufschütteln der Zerkarien teilten wir diese auf mehrere Feindosierungsspritzen (Fa. B. Braun, Omnifix-F 1ml) auf. Je nach Konzentration (100-250 Zerkarien/ml) wurden pro Spritze 500 bis 750 µl aufgezogen. Diese wurden den Mäusen (Fa. Charles River Deutschland, NMRI ♀♀) subkutan injiziert (Kanüle: Fa. Dispomed Neobject 20Gx1½·).

Bis zum Heranreifen der adulten *S. mansoni* vergingen ca. sechs bis acht Wochen. Hinweis für ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium waren vor allem Zeichen der Anämie, wie z.B. abgeblasste Schleimhäute. Weiterhin zeigten die Mäuse eine verminderte Aktivität.

Zur Isolierung der adulten Schistosomen wurden der Darm und das Mesenterium entnommen und voneinander getrennt. Das Mesenterium wurde in eine Petrischale gegeben und unter dem Lupenmikroskop durchgemustert. Im Schnitt konnten pro Maus zwischen 15 und 50 adulte Wurmpaare entnommen werden. Diese wurden im Puffer PBS (Phosphate buffered saline) bei -70°C gelagert.

### **3.2.2 Verarbeitung der adulten *Schistosoma mansoni***

#### **Reagenzien**

##### Saccharose-HEPES-Puffer (pH 7,2)

- Saccharose (Fa. Merck 7651) 428 mg
- HEPES (Fa. Sigma H-3375) 590 mg
- EDTA (Fa. Sigma 57 H-0184) 30 mg
- Aqua dest. auf 50 ml auffüllen

##### UREA-Puffer

- UREA (Fa. Sigma U-5378) 48 g in 100 ml Aqua dest.
- TRIS-HCl (Fa. Sigma T-3253) 0,79 g in 100 ml Aqua dest.

##### Butanol

- n-Butanol (Fa. Merck 101 990) ca. 5 ml

##### Glutaraldehyd

- Glutaraldehyd (Fa. Sigma G-5882) ca. 5 ml

#### **Ausführung**

Zunächst wurden die Schistosomen und 2 ml Saccharose-HEPES-Puffer in eine Mörserschale gegeben und mit einer Schere zerkleinert. Anschließend wurden sie mit weiteren 4 ml Saccharose-HEPES-Puffer in einen Kolben (Fa. Edmund Bühler, Homogenisator HO4) überführt und bei 4°C gelagert. Zur weiteren Zerkleinerung wurden die Schistosomen für ca. 5 Minuten bei 4°C in einem Messerhomogenisator (Fa. Edmund Bühler, Homogenisator HO4) gegeben. Um die Zerkleinerung der Schistosomen mitverfolgen zu können, haben wir jede Minute ein Nativpräparat

angefertigt. Zur weiteren Auftrennung des Gewebes wurde dieses für jeweils eine Minute, bei 4°C, mit einer Geschwindigkeit von 70% der Maximalgeschwindigkeit homogenisiert (Fa. Colora Zell-Homogenisator 5582). Auch hier wurde während der einzelnen Zeitintervalle ein Nativpräparat angefertigt. Nach dem Auftreten von freiliegenden, aber unbeschädigten Zellkernen wurde die Homogenisierung abgebrochen.

Anschließend wurden die homogenisierten Schistosomen über zwei Lagen Gaze gefiltert. Die gefilterte Flüssigkeit wurde bei 4°C für 20 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 2000 rotations per minute (rpm) zentrifugiert (Fa. Sorvall, RC 5B Plus). Den Überstand bezeichneten wir nach Tsang et al. als „Lösliche Zellkern-Fraktion“. Der Überstand wurde anschließend für 20 Minuten bei 4°C mit einer Geschwindigkeit von 8000 rpm zentrifugiert (Fa. Sorvall, RC 5B Plus) und danach bei 4°C gelagert. Diesen Überstand bezeichneten wir als „Lösliche mitochondriale Fraktion“. Das im Röhrchen abgesetzte Pellet der 2000er Zentrifugation wurde mit Saccharose-HEPES-Puffer im Verhältnis 1:1 aufgeschüttelt und dann nochmals mit einer Geschwindigkeit von 2000 rpm für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert (Fa. Sorvall, RC 5B Plus). Danach wurde der Überstand der zweiten 2000er („Lösliche Zellkern-Fraktion“) und das Pellet der ersten 8000er Zentrifugation zusammengegeben und nochmals für 20 Minuten bei 4°C mit 8000 rpm zentrifugiert (Fa. Sorvall, RC 5B Plus). Nun wurde der Überstand der ersten und zweiten 8000er Zentrifugation („Lösliche mitochondriale Fraktion“) für 3 Stunden mit einer Geschwindigkeit von 50000 rpm (226000 x g) zentrifugiert (Fa. Beckmann, Spinco L2-50B). Diesen Überstand bezeichneten wir als „Lösliche mikrosomale Fraktion“.

Nach Entnahme des Überstands („Lösliche mikrosomale Fraktion“) wurde dieser mit UREA-Puffer im Verhältnis 1:1 versetzt. Um die verbliebenen Membranbestandteile des endoplasmatischen Retikulums aufzutrennen, wurde das UREA-Überstandgemisch für 5 Minuten mit Ultraschall (Fa. Branson Sonic Power Co., Sonifier B12) behandelt. Auch hier wurde darauf geachtet, dass die Temperatur der Flüssigkeit 4°C nicht überschreitet.

Danach wurde für 30 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 20000 rpm bei 4°C zentrifugiert (Fa. Sorvall, RC 5B Plus). Das Pellet wurde verworfen und der Überstand wurde mit Butanol versetzt und 30 Minuten gemischt. Butanol diente zur Trennung der Fette von dem übrigen Überstand. Daraufhin wurde für 15 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 20000 rpm bei 4°C zentrifugiert (Fa. Sorvall, RC 5B Plus)

und nachdem man das Röhrchen aus der Zentrifuge entnommen hatte, zeigte das Butanolgemisch eine Vierschichtung: Die oberste Schicht bestand aus Butanol, gefolgt von einer Fettschicht. Darunter befand sich eine wässrige braune Phase, die mikrosomale Fraktion (MAMA). Bei dem unten abgesetzten Pellet handelte es sich um eine Ablagerung von Zellresten.

Die mikrosomale Fraktion (ca. 6 ml) wurde mit einer Kanüle vorsichtig aufgenommen, anschließend fraktioniert und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Alle Pellets wurden in Glutaraldehyd fixiert und anschließend elektronenmikroskopisch dargestellt.

### 3.2.3 Antigengewinnung für das SEA-Antigen

#### Reagenzien

##### 1%ige Pepsin-NaCl-Lösung (pH 1,8)

Pepsin (Fa. Merck 1.07190.)	1 g
0,9%ige NaCl-Lösung	100 ml

##### 1%ige Trypsinverdauungslösung (pH 7,5-8,0)

Trypsin (Fa. Fluka 93613)	1-1,5 g
PBS-Puffer (Phosphate buffered saline) (pH 7,2)	100 ml

##### PBS-Puffer (Phosphate buffered saline) (pH 7,2)

- NaCl (Fa. Merck 106 404) 72,0 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Fa. Merck 6586) 14,8 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Fa. Merck 4873) 4,3 g
- Auf 10 l Aqua dest. auffüllen

#### Ausführung

Zur Gewinnung der Schistosomen-Eier (*S. mansoni*) eignen sich Leber und Darm der infizierten Mäuse. Nach der Entnahme von Leber und Darm wurden diese zunächst mit einer Schere und anschließend bei  $4^{\circ}\text{C}$  in einem Homogenisator (Fa. Colora Zell-Homogenisator 5582) zerkleinert. Zu den zerkleinerten Organen wurde nun 1%ige Pepsin-NaCl-Lösung (pH 1,8), pro Organ ca. 10 ml, gegeben und für 2 Stunden unter Schütteln in ein Wasserbad mit einer Temperatur von  $37^{\circ}\text{C}$  gegeben. Hier kontrollierten wir alle 30 Minuten den pH-Wert und korrigierten diesen bei Bedarf mit HCl. Anschließend wurde der Überstand verworfen und wir gaben das Sediment in 1%ige Trypsinverdauungslösung (pH 7,5-8,0), pro Organ ca. 10 ml. Auch dieses

Gemisch wurde unter Schütteln für 4-5 Stunden in ein Wasserbad (37°C) gegeben. Um die größten Gewebestücke zu entfernen, wurde die Suspension mehrfach gesiebt (Fa. Retsch Analysensieb, Maschenweite 100 µm) und mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen, bis der Überstand klar war. Die nun von Gewebe getrennten Schistosomen-Eier wurden dann für eine Stunde homogenisiert (Fa. Colora Zell-Homogenisator 5582). Danach wurde die Suspension bei 4°C für 30 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 13000 rpm zentrifugiert (Fa. Sorvall, RC 5B Plus). Der Überstand wurde entnommen und bei 4°C gelagert. Zu dem abgesetzten Sediment wurde PBS gegeben und dieses nochmals für ca. eine Stunde homogenisiert und anschließend nochmals für 30 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entnommen und ebenfalls bei 4°C gelagert. Das restliche Sediment wurde für eine Minute mit Ultraschall (50 Watt) (Fa. Branson Sonic Power Co., Sonifier B12) behandelt und anschließend wie oben beschrieben nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und zu den zuvor gelagerten Überständen gegeben. Den Eiweißgehalt des gewonnenen Antigens bestimmten wir mit Hilfe der Biuret-Methode (siehe unten) (Fa. Sigma Microprotein Determination, Cat. No. 690-A) (Ohnishi et al., 1978). Anschließend wurde das Antigen portioniert und bei -70°C gelagert.

### **3.3 Proteinbestimmung nach Ohnishi (Ohnishi et al., 1978)**

Den Eiweißgehalt des gewonnenen Antigens bestimmten wir mit Hilfe der Biuret-Methode (Fa. Sigma Microprotein Determination, Cat. No. 690-A).

Zunächst wurden fünf Standardproteinkonzentrationen nach der Reaktion mit Biuret- und Folinreagens photometrisch gemessen und eine Eichkurve erstellt. Das Antigen (unverdünnt, verdünnt: 1:5, 1:10) wurde gleichermaßen mit Biuret und Folin versetzt und über ein Photometer (Fa. SLT 16598) gemessen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Extinktionswerte in die Eichkurve eingetragen.

Nach der oben beschriebenen Methode ergab sich ein Proteingehalt von 595 µg/ml für das SEA-Antigen und 415 µg/ml für das MAMA-Antigen.

### **3.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Zum serologischen Nachweis von Antikörpern gegen *S. mansoni* und *S. haematobium* wurde der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) verwendet.

Hierbei wurden zunächst die oben genannten Seren mittels SEA-Antigen und anschließend mittels MAMA-Antigen getestet. Die Wiederholung der Testung auf SEA-Antigen wurde nötig, da sich herausstellte, dass die Aktivität der Seren über die Jahre nachlassen kann.

## Reagenzien

### PBS-Puffer (Phosphate buffered saline) (pH 7,2)

- NaCl (Fa. Merck 106 404) 72,0 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fa. Merck 6586) 14,8 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fa. Merck 4873) 4,3 g
- Auf 10 l Aqua dest. Auffüllen

### Coating-Puffer: 0,1 M Na-Carbonat-Puffer (pH 9,6)

- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Fa. Merck 6392) 3,1 g
- NaHCO<sub>3</sub> (Fa. Merck 6329) 5,9 g
- NaN<sub>3</sub> (Fa. Merck 6688) 0,1 g
- Auf 1 l Aqua dest. auffüllen

### Inkubationspuffer: PBS-BSA 5%

- PBS 100 ml
- Bovine Serum Albumin (BSA) (Fa. Roche 735 086) 5,0 g
- Tween 20 (Fa. Merck 822 184) 100 µl

### Substratpuffer: 0,1 M Phosphat-Citratpuffer (pH 5,0)

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fa. Merck 6586) 14,2 g in 1 l Aqua dest.
- Citronensäure (Fa. Merck 244) 21,0 g in 1 l Aqua dest.
- davon mischen: 680 ml Phosphatpuffer mit  
320 ml Citronensäure
- pH Einstellung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Fa. Merck 108 597) 100 µl/100 ml
- vor Gebrauch eine Tablette Phenylenediamine (OPD) (10 mg) (Fa. Sigma P-8287) in 60 ml Substratpuffer auflösen

### Konjugatverdünnung

- IgG-Konjugat (Fa. DAKO P 214) 5 µl
- Inkubationspuffer 10 ml

### Waschlösung

- PBS 1l
- Tween 20 (Fa. Merck 822 184) 1 ml

### Mikrotiterplatte

- Platte mit je 96 kobaltsterilen Vertiefungen aus Polystyrol in F-Form (Fa. Dynatech, Nr. M 17981000 B)

## **3.4.1 Konzentration des Antigens**

Nach der Ermittlung der geeigneten Beschichtungskonzentration durch Schachbrett-Titration ergaben sich folgende Werte: Für die Beschichtung mit SEA-Antigen 2 µg/ml Coatingpuffer und für das MAMA-Antigen 1 µg /ml Coatingpuffer.

## **3.4.2 Verdünnung der Seren für die Beschichtung mit SEA-Antigen**

Zur Ermittlung einer Standardkurve wurde das positive Kontrollserum wie folgt mit Inkubationspuffer verdünnt: 1:200, 1:666, 1:2000 und 1:20000. Das Patientenserum wurde 1:160 und die Negativkontrolle 1:320 verdünnt.

## **3.4.3 Verdünnung der Seren für die Beschichtung mit MAMA-Antigen**

Für die Standardkurve wurde das positive Kontrollserum im Verhältnis 1:15, 1:48, 1:150 und 1:1500 verdünnt. Das Patientenserum und die Negativkontrolle wurden jeweils 1:200 verdünnt.

## **3.4.4 Testansatz und Ausführung**

Zunächst wurden die Polystyrol-Näpfe mit 100 µl Antigenlösung eine Stunde bei 37°C und anschließend für 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Näpfe mit Waschlösung fünfmal gewaschen. Um eventuell unbeschichtete Areale mit Albumin zu beschichten, wurde jede Vertiefung nochmals für eine Stunde mit 200 µl Inkubationspuffer bei 37°C inkubiert und anschließend fünfmal gewaschen.

Nach der oben aufgeführten Verdünnung der Kontroll-, Negativ- und Patientenseren mit Inkubationspuffer, wurden pro Napf 100 µl einpipettiert und für eine Stunde bei

37°C inkubiert. Für jede Platte wurde eine Standardkurve erstellt, bei der das positive Kontrollserum nach oben aufgeführter Verdünnung im Doppelansatz einpipettiert wurde. Ebenfalls doppelt wurden die Negativkontrolle und der Blank angesetzt. Die Untersuchung der Patientenserum erfolgte im Dreifachansatz, das heißt, dass die dritte Vertiefung nicht mit Antigen, sondern lediglich mit Albumin beschichtet wurde. Dieser Ansatz wurde gewählt, um eventuelle Reaktionen zwischen Albumin des Inkubationspuffers und dem Patientenserum nachweisen zu können.

Anschließend wurde wiederum, wie oben beschrieben, gewaschen und in jeden Napf 100 µl Konjugatverdünnung gegeben und nochmals für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde noch einmal gewaschen, um überschüssiges Konjugat zu entfernen.

Abschließend wurde jeder Napf mit 100 µl Substratlösung versetzt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Gestoppt wurde die Farbreaktion nach Ablauf der Inkubationsphase mit jeweils 100 µl 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Fa. Merck 109072).

Die photometrische Messung erfolgte mit einem Reader (Fa. SLT 16598), bei einer Wellenlänge von 492 nm.

Der Cut-off Wert entspricht dem 2,5-fachen Wert des negativen Serumpools, ermittelt mit einem Konfidenzintervall von 95% aus Proben seronegativer Blutspender. Dieses ergibt eine rein qualitative Bewertung der Befunde. Der Cut-off Wert lag bei einer Extinktion von 0,26.

### **3.5 Natrium Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Enzyme-linked Immunoelctrotransfer blot (EITB)**

Zur Auftrennung des Antigens verwendeten wir die analytische SDS-PAGE Elektrophorese. Hierbei wurde das Antigen zunächst über ein Gradientengel aufgetrennt und anschließend auf eine Polyvinylidifluorid-Folie übertragen. Nun waren die einzelnen Antigenbestandteile den im Patientenserum eventuell vorkommenden Antikörpern frei zugänglich und es kam zu einer Bindung. Nach dem Zusatz eines mit Peroxidase gebundenen Antikörpers, Substrat (Peroxil) und eines Farbstoffs konnten einzelne Abschnitte, in denen es zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion gekommen war, dargestellt werden.

### 3.5.1 Polyacrylamid-Gradientengel

Zur Auftrennung des Antigens haben wir zunächst ein 3-20% lineares Gradientengel nach Hempelmann hergestellt (Hempelmann, 1984).

#### Reagenzien

##### Acrylamid-Lösung, 40%

- Acrylamid (Fa. Pharmacia Biotech No 17-1300-01) 38,9 g
- NN'-Methylenbisacrylamid (BIS) 1,1 g  
(Fa. Pharmacia Biotech No 17-1304-01)
- Aqua dest. auf 100 ml auffüllen

##### Ammoniumpersulfat-Lösung

- Ammoniumpersulfat (PER) 50 mg  
(Fa. Bio-Rad Nr. 161-0700)
- Aqua dest. 1000 µl

##### Tetramethylethyldiamin (TEMED)

- NNN'-Tetramethylethyldiamin  
(Fa. Pharmacia 17-1312-01)
  - 5 µl für 3%iges Gel
  - 5 µl für 20%iges Gel
  - 2,5 µl für die Abdichtung der Glasplatten

#### 3%iges Gel\*

- 0,8 M Tris-HCl (ph 8,6) 2,0 ml  
(Tris: Fa. Sigma T 1503, HCl: Fa. Merck 9057 1000)
- Acrylamid-Lösung, 40% 750 µl
- Aqua dest. 7,25 ml
- Ammoniumpersulfat-Lösung 200 µl

#### 20%iges Gel\*

- 0,8 M Tris-HCl (ph 8,6) 2,0 ml  
(Tris: Fa. Sigma T 1503, HCl: Fa. Merck 9057 1000)
- Acrylamid-Lösung, 40% 5,0 ml
- Aqua dest. 3,0 ml
- Ammoniumpersulfat-Lösung 200 µl

\* Die Mengenangaben sind geeignet für ein 1,5 mm dickes Gradientengel.

## **Ausführung**

Als erstes wurden zwei fettfreie Glasplatten, getrennt durch zwei 1,5 mm dicke Abstandshalter, in den Gelgießstand (Fa. Bio-Rad Nr. 165-2943) eingespannt. Zur Abdichtung wurden 300 µl des 20%igen Gels mit 2,5 µl TEMED versetzt und gleichmäßig zwischen die Platten einpipettiert. Nach einer fünfminütigen Polymerisation war das Gel ausgehärtet und die Platten dadurch versiegelt. Um die Lösungsmenge des 3%igen Gels anzugleichen, wurden von diesem 300 µl verworfen. Anschließend wurden zu den Gel-Lösungen nun jeweils 5 µl TEMED hinzugegeben und unverzüglich in die vordere bzw. hintere Kammer des Gradientenmischers (Fa. Bio-Rad Nr. 385) gegeben. Danach wurden beide Kammern in Verbindung gesetzt und mittels einer Schlauchpumpe (Fa. Desaga 131900) wurden die Gel-Lösungen gleichmäßig zwischen den Platten verteilt, bis zu einer Höhe von ca. 1 cm unterhalb der Glaskante. Um das Antigen und die Referenzproteine voneinander getrennt auftragen zu können, wurde direkt im Anschluss vorsichtig ein Kamm unter Ausschluss von Luftblasen eingefügt. Dieser Kamm hat eine schmale Ausbuchtung für die Referenzproteine und eine breite Ausbuchtung für das Antigen. Das Gel war nach ca. vier Stunden gebrauchsfertig. Während dieser Zeit wurde es mit feuchten Tüchern bedeckt und bei 4°C gelagert. Unter diesen Bedingungen ist das Gel mehrere Tage haltbar.

### **3.5.2 Gelelektrophorese**

#### **Reagenzien**

##### **Anodenpuffer**

- Tris (Fa. Sigma T 1503) 3,84 g
- Glycin (Fa. Merck 8488) 2,40 g
- Aqua dest. 800 ml

##### **Kathodenpuffer**

- Anodenpuffer 150 ml
- SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz) 150 mg  
(Fa. Merck 1.13760.000)

### Probenpuffer

- 2,5%iges Mercaptoethanol 2,5 ml  
(Fa. Merck 115 433)
- Bromphenolblau (Fa. LKB 1840901) 0,5 mg  
– wurde zur Probe im Verhältnis  
1:1 hinzugegeben

### Referenzproteine

- Low Molecular Weight-Marker (LMW) 10 µl  
(Fa. Pharmacia Biotech 17 0446)

### Ausführung

Das Antigen (100 µl) und die Referenzproteine wurden im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten im Wasserbad aufgeköcht. Die Glasplatten wurden von überschüssigem Gel gesäubert, der Kamm vorsichtig entfernt und anschließend wurden die Glasplatten mit dem Gel in die Elektrophorese-Kammer (Fa. Bio-Rad Mini Protean II Cell Nr. 265-2940) eingespannt. Nun wurden der Anodenpuffer in die äußere und der Kathodenpuffer in die innere Kammer gegeben. Hierbei war darauf zu achten, dass die Glasplatten, bzw. das Gel mit Puffer bedeckt sind. Anschließend wurde das Antigen gleichmäßig in die breite Vertiefung und die Referenzproteine in die schmale Vertiefung aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 4°C mit konstant 150 Volt für ca. 3-4 Stunden (Fa. Amersham pharmacia biotech, Elektrophoresis Power Supply EPS 601). Als Anhalt für die Beendigung des Laufs diente die Wanderung der durch Bromphenolblau gefärbten Front.

### **3.5.3 Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) (Westernblot)**

#### Reagenzien

- |   |            |
|---|------------|
| <u>Transferpuffer (Towbin et al., 1979)</u> | pH 9,0-9,4 |
| • Tris (Fa. Sigma T 1503)                   | 3 g        |
| • Glycin (Fa. Merck 8488)                   | 14,5 g     |
| • Methanol (Fa. Riedel-de Haën 24229)       | 200 ml     |
| • Aqua dest.                                | 800 ml     |

## Ausführung

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Gel für 5-15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert, um die überschüssigen Salze und Detergenzien zu entfernen. Während dieser Zeit wurden die Polyvinylidendifluorid-Transfer-Membran-Folie (Fa. Millipore, Immobilon) und sechs Lagen Filterpapier auf die entsprechende Größe zugeschnitten (ca. 8 x 9 cm). Die Membran-Folie wurde für 20 Sekunden in Methanol, danach für eine Minute in Aqua dest. und abschließend in Transferpuffer gelagert. Das Filterpapier musste ebenfalls für einige Minuten mit Transferpuffer getränkt werden.

Für den Transfer wurde die Trans-Blot-Zelle (Fa. Bio-Rad, Trans-Blot Semi-Dry Nr. 170-3940) verwendet. Drei mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere wurden auf der Anodenplatte platziert. Auf das Filterpapier wurden die vorbereitete Membran-Folie, das äquilibrierte Gel und drei mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Nach jedem Schritt mussten eventuell eingeschlossene Luftblasen vorsichtig mit einer Walze entfernt werden. Abschließend wurden die Kathode und der Schutzdeckel aufgesetzt.

Der Transfer erfolgte bei 140 mA für 90 Minuten (Fa. Amersham pharmacia biotech, Elektrophoresis Power Supply EPS 601).

### **3.5.4 Färben des Gels**

#### Reagenzien

##### Färbelösung

- Coomassie Brillantblau R 350 (Fa. Merck 1.12553) 5 g
- Essigsäure 96% (Fa. Merck 1.00058) 100 ml
- Methanol (Fa. Riedel-de Haën 24229) 250 ml
- Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

##### Entfärbelösung

- Essigsäure 96% (Fa. Merck 1.00058) 200 ml
- Methanol (Fa. Riedel-de Haën 24229) 500 ml
- Aqua dest. 1300 ml

### Imprägnierbad

- Methanol (Fa. Riedel-de Haën 24229) 50 ml
- Glycerin 20 ml
- Aqua dest. 30 ml

### Ausführung

Das Gel wurde für ca. 12 Stunden in die Coomasie-Färbelösung gegeben und danach mehrmals in frische Entfärbelösung gelegt um überschüssige Farbe auszuwaschen. Im Falle eines vollständigen Transfers ließen sich keine verbliebenen Proteinbanden nachweisen.

Zur Aufbewahrung des Gels wurde dieses für eine Stunde in das Imprägnierbad gelegt und anschließend in Polyester- und Cellophanfolie eingeschweißt (Hempelman et al., 1986).

## **3.5.5 Verarbeitung der Membran-Folie**

### Reagenzien

#### Färbelösung

- Amido-Schwarz 10B (Fa. ICN 100 563) 400 mg

#### Entfärbelösung

- Essigsäure 96% (Fa. Merck 1.00058) 10 ml
- Methanol (Fa. Riedel-de Haën 24229) 50 ml
- Aqua dest. 40 ml

#### Immunblotlösung

- PBS-Puffer (pH 7,2) 500 ml
- Tween 20 (Fa. Merck 822 184) 1,5 ml

### Ausführung

Zunächst wurden der Referenzrandstreifen (ca. 10 mm) und der gegenüberliegende Randstreifen (ca. 6 mm) mit einem Skalpell abgetrennt und für ca. 3 Minuten in Amido-Schwarz gefärbt. Danach wurden die Randstreifen für wenige Minuten in die Entfärbelösung gegeben, anschließend getrocknet und dunkel gelagert.

Das Mittelstück wurde währenddessen in Immunblotlösung gegeben und für 30 Minuten abgeblockt. Anschließend wurde dieses getrocknet, in ca. 3-5 mm breite

Streifen geschnitten und beschriftet. Die Streifen wurden dann sofort verarbeitet oder bei -70°C gelagert.

### **3.5.6 Verarbeitung der Westernblot-Streifen**

#### **Reagenzien**

##### Immunblotlösung

- PBS-Puffer (pH 7,2) 500 ml
- Tween 20 (Fa. Merck 822 184) 1,5 ml

##### Konjugatlösung

- Blottolösung 2 ml pro Streifen
- IgG-Konjugat (Fa. DAKO P 214) 3,5 µl pro Streifen

##### Substratlösung\*

- Aqua bidest. 23,25 ml
- Tris-HCl 1 M 1,25 ml
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (Fa. Merck 108597) 25 µl
- 3,3'-Diaminobenzidine (Fa. Sigma 5905) 10 mg (1 Tablette)

\* Nach der Zugabe der 3,3'-Diaminobenzidine-Tablette wurde die Substratlösung gefiltert und bis zu ihrem Gebrauch dunkel gelagert.

#### **Ausführung**

Pro Testansatz wurde ein Westernblotstreifen in jeweils eine Vertiefung des Schüttelbretts gelegt (Fa. Desaga, Diffusions-Entfärbepappatur 146 340). In jede Vertiefung wurden 2 ml Immunblotlösung gegeben und anschließend das Patientenserum einpipettiert:

- positives Kontrollserum 6 µl Serum
- negatives Kontrollserum 6 µl Serum
- pro Patient 2 Streifen 6 µl Serum und 60 µl Serum.

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde die Serumverdünnung verworfen, die Streifen viermal für jeweils 5 Minuten mit Immunblotlösung gewaschen und anschließend die Konjugatlösung hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde die Konjugatlösung verworfen und die Streifen viermal für jeweils

5 Minuten mit Immunblotlösung gewaschen. Danach wurden die Streifen nochmals zweimal für 5 Minuten mit PBS gespült.

Abschließend wurden zu den Streifen jeweils 2 ml Substratlösung gegeben. Unter Schwenken der Streifen beobachteten wir die Farbentwicklung, wobei wir uns hier an der positiven Kontrolle orientieren konnten. Gestoppt wurde die Reaktion mit Aqua dest. Nachdem die Streifen getrocknet waren, wurden diese zur Aufbewahrung trocken und dunkel gelagert.

Zur Auswertung der Banden wurden die Streifen mit den Referenzrandstreifen, der Positiv- und der Negativkontrolle verglichen. Mit Hilfe der Referenzproteine konnten die Molekulargewichte der einzelnen Banden ermittelt werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 ELISA-Ergebnisse

#### 4.1.1 ELISA mit Serumproben der Patienten mit einer nachgewiesenen Schistosomeninfektion

##### 4.1.1.1 Vergleich von Sensitivität und Spezifität aller getesteten Proben im SEA- und MAMA-ELISA

Mit Hilfe des ELISA wurden 403 Serumproben auf spezifische Antikörper gegen lösliche Ei-Antigene (SEA) oder die mikrosomale Fraktion von *S. mansoni* Adulten (MAMA) untersucht. Die Anzahl der Proben setzte sich aus 30 Seren mit einer gesicherten Schistosomen-Infektion, 231 Seren von Patienten mit anderen Helminthiasen und 142 Negativ-Kontrollseren zusammen.

Von den 30 Seren der Patienten mit einer gesicherten Schistosomeninfektion erfasste der SEA-ELISA 25 Proben. Dies ergab eine Sensitivität von 83,3%. Der MAMA-ELISA erfasste von den 30 Proben nur zehn Patientenseren, woraus sich eine Sensitivität von 33,3% ergab.

Bei der Austestung der Seren von Patienten mit anderen Helminthosen wurden vom SEA-ELISA von den insgesamt 231 Proben 19 Seren falsch positiv erfasst. Daraus ergab sich eine Spezifität von 91,7%. Der MAMA-ELISA erfasste dagegen nur 15 Seren falsch positiv. Dies ergab eine Spezifität von 93,5%.

Der positive prädiktive Wert, der die Wahrscheinlichkeit angibt, ob eine Erkrankung vorliegt, betrug für den SEA-ELISA 56,8%, dagegen nur 25% für das MAMA-Antigen. Der negative prädiktive Wert, der die Wahrscheinlichkeit angibt, dass keine Erkrankung vorliegt, betrug für den SEA-ELISA 97,6% und für den MAMA-ELISA 97,7%.

In den Abbildungen 5 und 6 ist eine Übersicht aller getesteten Seren und deren Ergebnisse dargestellt.

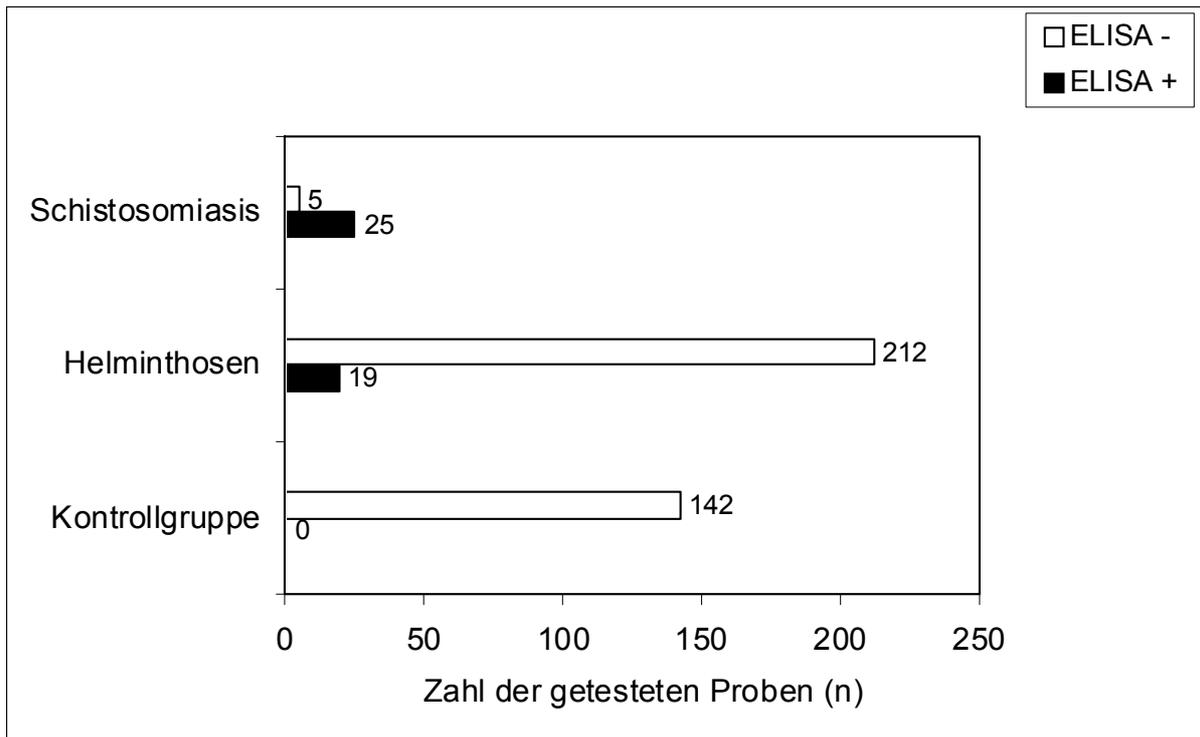


Abbildung 5: Ergebnisse des SEA-ELISA im Überblick (n=403)

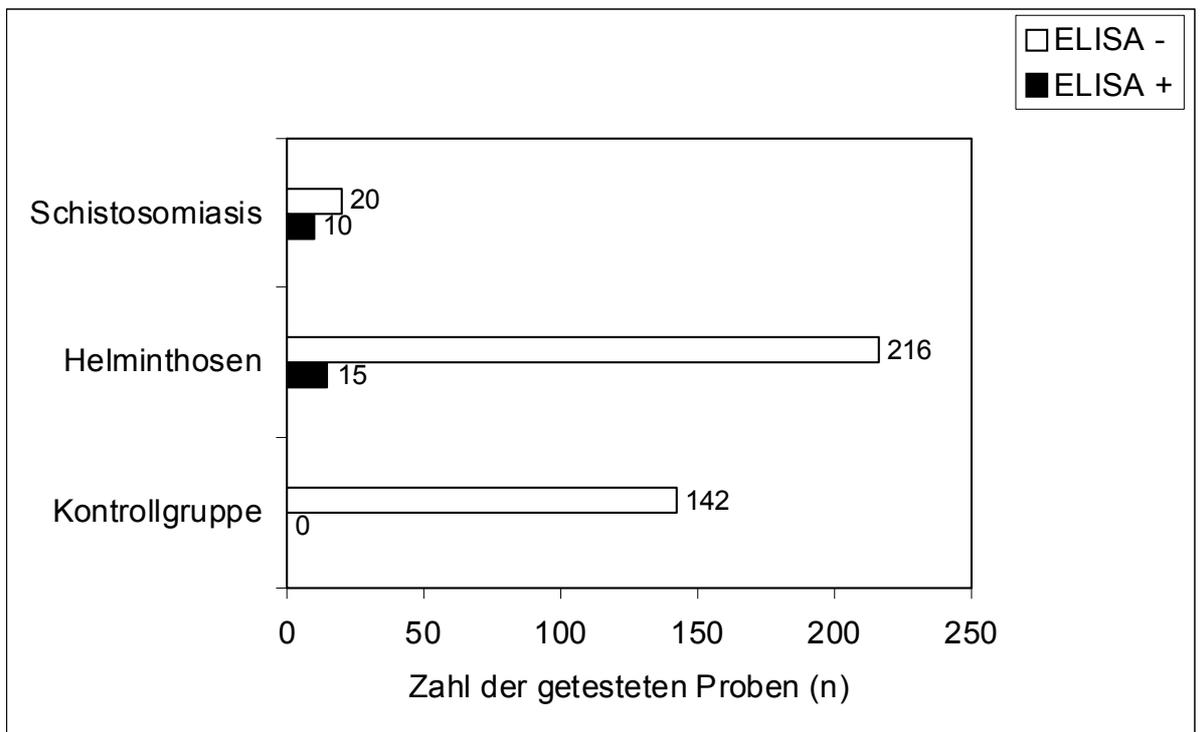


Abbildung 6: Ergebnisse des MAMA-ELISA im Überblick (n=403)

#### **4.1.1.2 Proben von deutschen Patienten, die in einem Zeitraum von sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden**

Wie oben ausgeführt, handelte es sich hier um sieben Patienten, bei denen die Blutabnahme in einem Zeitraum von sechs Monaten nach der Infektion erfolgte.

Von den sieben Seren reagierten sechs Proben im SEA-ELISA positiv; bei einer Probe sprach der ELISA nicht an und war somit falsch negativ.

Im MAMA-ELISA reagierten lediglich zwei von sieben Serumproben positiv, das heißt fünf Proben wurden nicht erfasst und sind falsch negativ.

##### **4.1.1.2.1 Vergleich von Sensitivität und Spezifität**

Von den sieben Seren der deutschen Patienten mit einer gesicherten Schistosomeninfektion, die innerhalb von sechs Monaten abgenommen wurden, erfasste der SEA-ELISA sechs Proben. Dies ergibt eine Sensitivität von 85,7%. Der MAMA-ELISA erfasste von den sieben Proben nur zwei Patientenseren, woraus sich eine Sensitivität von 28,5% ergab.

Bei der Austestung der Seren von Patienten mit anderen Helminthosen aus Nichtendemiegebieten wurden vom SEA-ELISA von den insgesamt 100 Proben vier Seren falsch positiv erfasst. Daraus ergab sich eine Spezifität von 96%. Der MAMA-ELISA erfasste dagegen nur zwei Seren falsch positiv. Dies ergab eine Spezifität von 98%.

Der positive prädiktive Wert betrug für den SEA-ELISA 60%, dagegen nur 50% für den MAMA-ELISA.

Der negative prädiktive Wert, betrug für den SEA-ELISA 98,9% und für den MAMA-ELISA 95,1%.

#### **4.1.1.3 Proben von deutschen Patienten, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden**

Hier handelte es sich um Seren von sechs Patienten, deren Infektionszeitpunkt mehr als sechs Monate zurücklag.

Von den sechs Seren sprachen drei auf den SEA-ELISA an.

Von dem MAMA-ELISA konnte keines der sechs Seren erfasst werden, das heißt, alle Seren waren falsch negativ.

##### **4.1.1.3.1 Vergleich von Sensitivität und Spezifität**

Von den sechs Seren erfasste der SEA-ELISA drei Proben. Dies ergab eine Sensitivität von 50%. Der MAMA-ELISA erfasste keines der sechs Seren.

Bei der Austestung der Seren von Patienten mit anderen Helminthosen aus Nichtendemiegebieten wurden vom SEA-ELISA von den insgesamt 100 Proben vier Seren falsch positiv erfasst. Daraus ergab sich eine Spezifität von 96%. Der MAMA-ELISA erfasste dagegen nur zwei Seren falsch positiv. Dies ergab eine Spezifität von 98%.

Der positive prädiktive Wert betrug für den SEA-ELISA 42,8%. Der negative prädiktive Wert betrug für den SEA-ELISA 96,9% und für den MAMA-ELISA 94,2%.

#### **4.1.1.4 Proben von Patienten aus Endemiegebieten**

Hier standen uns insgesamt 17 Serumproben zur Verfügung, die ebenfalls zunächst auf SEA- und dann auf MAMA-Antigen getestet wurden.

Im SEA-ELISA konnten 16 Patienten erfasst werden und nur ein Serum reagierte falsch negativ. Beim MAMA-ELISA reagierten von den 17 Patientenseren lediglich acht positiv. Somit wurden neun Seren nicht erfasst und reagierten damit falsch negativ.

##### **4.1.1.4.1 Vergleich von Sensitivität und Spezifität**

Von den 17 Seren erfasste der SEA-ELISA 16 Proben. Dies ergab eine Sensitivität von 94,1%. Der MAMA-ELISA erfasste von den 17 Proben acht Patientenseren, woraus sich eine Sensitivität von 47% ergab.

Bei der Austestung der Seren von Patienten mit anderen Helminthosen aus Endemiegebieten wurden vom SEA-ELISA von den insgesamt 131 Proben 15 Seren falsch positiv erfasst. Daraus ergab sich eine Spezifität von 88,5%. Der MAMA-ELISA erfasste dagegen 13 Seren falsch positiv. Dies ergab eine Spezifität von 90%. Der positive prädiktive Wert betrug für den SEA-ELISA 51,6% und für den MAMA-ELISA 38%. Der negative prädiktive Wert betrug für den SEA-ELISA 99,1% und für den MAMA-ELISA 92,9%.

#### **4.1.2 Patienten aufgeteilt nach *S. mansoni*- und *S. haematobium*-Infektionen**

In einem weiteren Schritt untersuchten wir, ob bezüglich der Sensitivität Unterschiede bestanden bei Patienten mit *S. mansoni*-Infektionen und Patienten mit *S. haematobium*-Infektionen. Von den 30 Serumproben hatten 16 Patienten einen Ei-Nachweis von *S. mansoni* und 13 Proben konnten einer Infektion mit *S. haematobium* zugeordnet werden. Ein Patient ließ sich nicht sicher der einen oder

anderen Erregerart zuordnen, so dass uns hier insgesamt 29 Seren zur Verfügung standen. Wie zuvor teilten wir auch hier wieder die Patienten auf in deutsche Patienten und Patienten aus Endemiegebieten. Die Proben der deutschen Patienten unterteilten wir ebenfalls nach dem Zeitpunkt der Materialabnahme. An Seren von deutschen Patienten standen uns 12 Seren und von den Patienten aus Endemiegebieten standen uns 17 zur Verfügung. Diese Aufteilung erschien uns sinnvoll, da man bei den Patienten aus den Endemiegebieten davon ausgehen musste, daß diese eventuell Koinfektionen mit *S. mansoni* und *S. haematobium* durchgemacht hatten.

#### **4.1.2.1 Ergebnisse aller getesteten Proben von *S. mansoni*-Patienten**

Bei den Patienten mit einer *S. mansoni*-Infektion erzielten wir im SEA-ELISA eine Sensitivität von 87,5% und im MAMA-ELISA eine Sensitivität von 43,7%.

#### **4.1.2.2 Ergebnisse aller getesteten Proben von *S. haematobium*-Patienten**

Bei den Patienten mit einer *S. haematobium*-Infektion erzielten wir im SEA-ELISA eine Sensitivität von 84,6% und im MAMA-ELISA eine Sensitivität von 30%.

#### **4.1.2.3 Ergebnisse aller Proben von deutschen *S. mansoni*-Patienten**

Bei den deutschen Patienten mit einer *S. mansoni*-Infektion erzielten wir im SEA-ELISA eine Sensitivität von 75% und im MAMA-ELISA eine Sensitivität von 25%.

#### **4.1.2.4 Proben von deutschen *S. mansoni*-Patienten, die in einem Zeitraum von sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden**

Bei den Proben der deutschen Patienten mit einer *S. mansoni*-Infektion, die in einem Zeitraum von sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden, erzielten wir im SEA-ELISA eine Sensitivität von 83% und im MAMA-ELISA eine Sensitivität von 33%.

#### **4.1.2.5 Proben von deutschen *S. mansoni*-Patienten, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden**

Bei den Proben der deutschen Patienten mit einer *S. mansoni*-Infektion, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden, erzielten wir im SEA-ELISA eine Sensitivität von 50% und im MAMA-ELISA reagierte keine der Proben positiv.

#### **4.1.2.6 Ergebnisse aller Proben von deutschen *S. haematobium*-Patienten**

Bei den deutschen Patienten mit einer *S. haematobium*-Infektion erzielten wir im SEA-ELISA eine Sensitivität von 75% und im MAMA-ELISA reagierte keine der Proben positiv.

#### **4.1.2.7 Probe von einem deutschen *S. haematobium*-Patienten, die in einem Zeitraum von sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden**

Bei der Probe des deutschen Patienten mit einer *S. haematobium*-Infektion, die in einem Zeitraum von sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurde, hat der SEA-ELISA diese Probe erfasst und im MAMA-ELISA reagierte diese Probe nicht.

#### **4.1.2.8 Proben von deutschen *S. haematobium*-Patienten, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden**

Bei den Proben der deutschen Patienten mit einer *S. haematobium*-Infektion, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden, erzielten wir im SEA-ELISA eine Sensitivität von 66% und im MAMA-ELISA reagierte keine der Proben positiv.

#### **4.1.2.9 Ergebnisse aller Proben von Patienten aus Endemiegebieten mit einer *S. mansoni*-Infektion**

Bei den Patienten aus Endemiegebieten mit einer *S. mansoni*-Infektion erzielten wir im SEA-ELISA eine Sensitivität von 100% und im MAMA-ELISA eine Sensitivität von 62%.

#### **4.1.2.10 Ergebnisse aller Proben von Patienten aus Endemiegebieten mit einer *S. haematobium*-Infektion**

Bei den Patienten aus Endemiegebieten mit einer *S. haematobium*-Infektion erzielten wir im SEA-ELISA eine Sensitivität von 100% und im MAMA-ELISA eine Sensitivität von 62%.

### 4.1.3 ELISA mit Serumproben der Patienten mit nachgewiesenen anderen Helminthosen

#### 4.1.3.1 Ergebnisse aller getesteten Proben

Bei der Testung mit SEA-Antigen kam es zu Kreuzreaktionen bei Patienten mit Infektionen durch *Ancylostoma duodenale*, *Echinococcus granulosus*, *Onchocerca volvulus*, *Strongyloides stercoralis*, *Trichinella spiralis* und *Trichuris trichiura*. In Abbildung 7 sind die einzelnen Kreuzreaktionen mit den verschiedenen Arten aufgeführt.

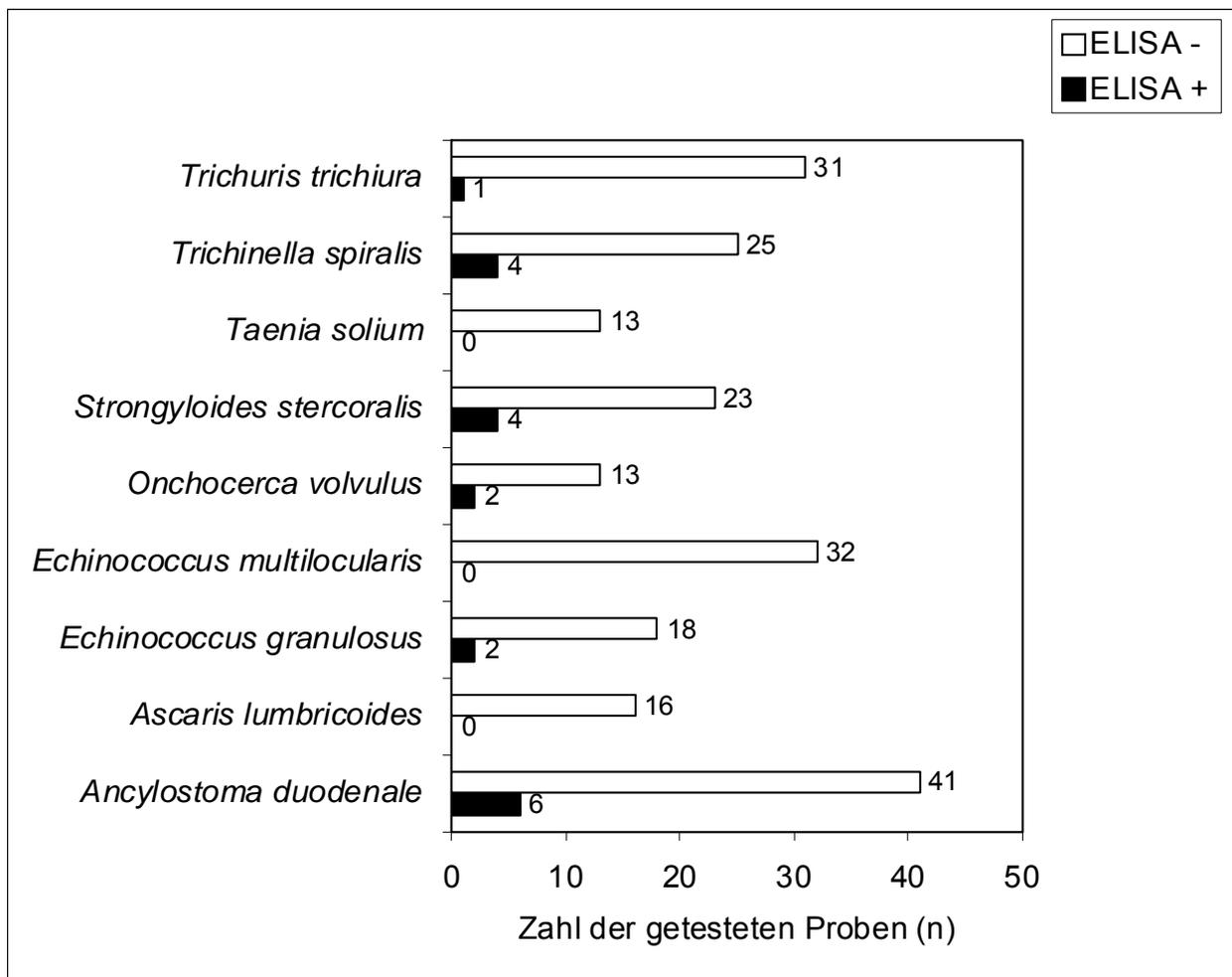


Abbildung 7: Ergebnisse des SEA-ELISA mit Proben von Patienten mit nachgewiesenen anderen Helminthosen (n=231)

Bei der Testung mit MAMA-Antigen kam es zu Kreuzreaktionen mit *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides*, *Echinococcus granulosus*, *Onchocerca volvulus*, *Strongyloides stercoralis*, *Taenia solium* und *Trichuris trichiura*. In Abbildung 8 sind die Erreger im Einzelnen dargestellt.

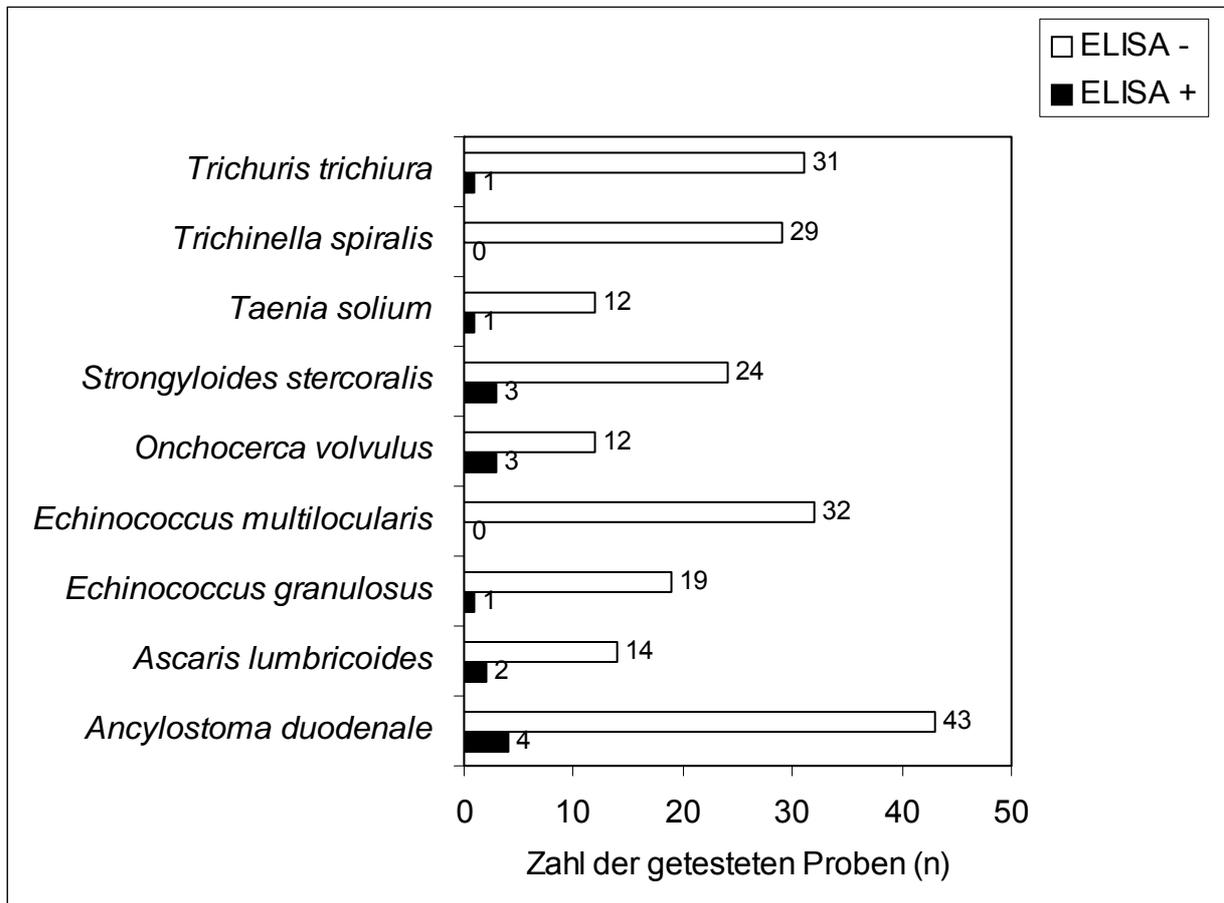


Abbildung 8: Ergebnisse des MAMA-ELISA mit Proben von Patienten mit nachgewiesenen anderen Helminthosen (n=231)

#### 4.1.3.2 Ergebnisse der Proben von Patienten aus Nichtendemiegebieten mit anderen Helminthosen

Bei diesen Patienten kam es bei der Testung auf SEA zu Kreuzreaktionen bei *Trichuris trichiura* und *Trichinella spiralis* (Abb. 9).

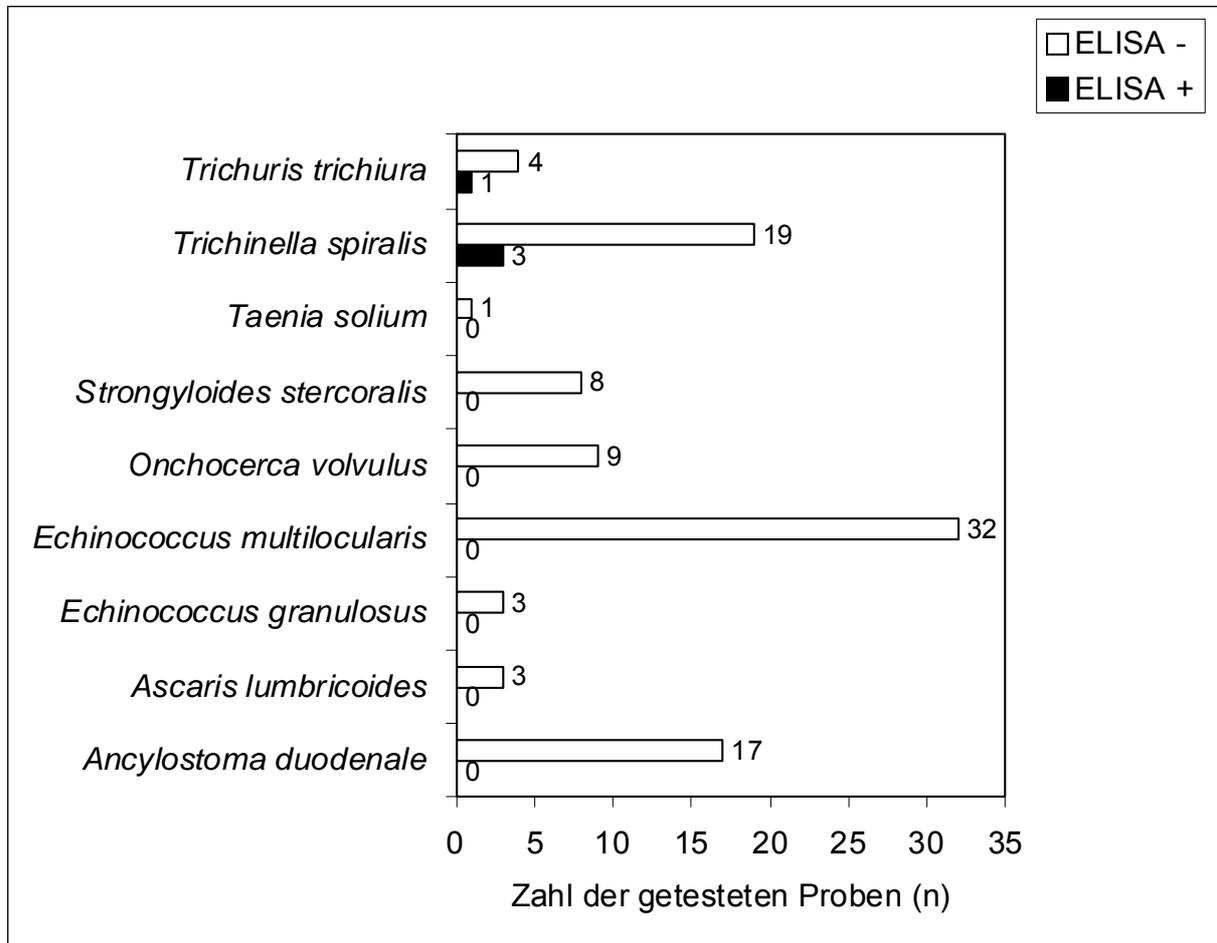


Abbildung 9: Ergebnisse des SEA-ELISA mit Proben von Patienten aus Nichtendemiegebieten mit anderen Helminthosen (n=100)

Bei der Austestung der Seren mit MAMA-Antigen kam es bei zwei Patienten zu einer Kreuzreaktionen mit *Echinococcus granulosus* und *Taenia solium* (Abb. 10).

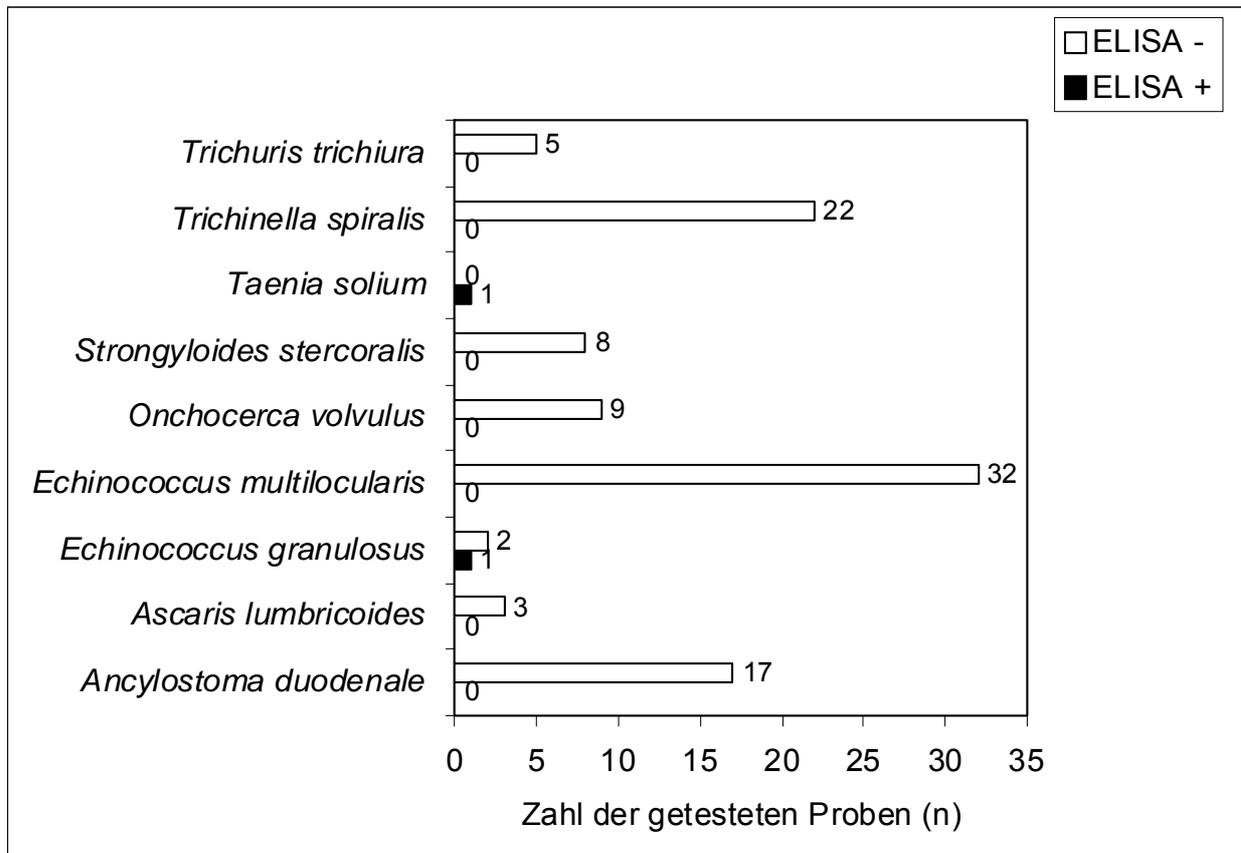


Abbildung 10: Ergebnisse des MAMA-ELISA mit Proben von Patienten aus Nichtendemiegebieten mit anderen Helminthosen (n=100)

#### 4.1.3.3 Ergebnisse der Proben von Patienten aus Endemiegebieten mit anderen Helminthosen

Hier kam es bei der Testung auf SEA zu Kreuzreaktionen bei *Trichinella spiralis*, *Strongyloides stercoralis*, *Onchocerca volvulus*, *Echinococcus granulosus* und *Ancylostoma duodenale* (Abb. 11).

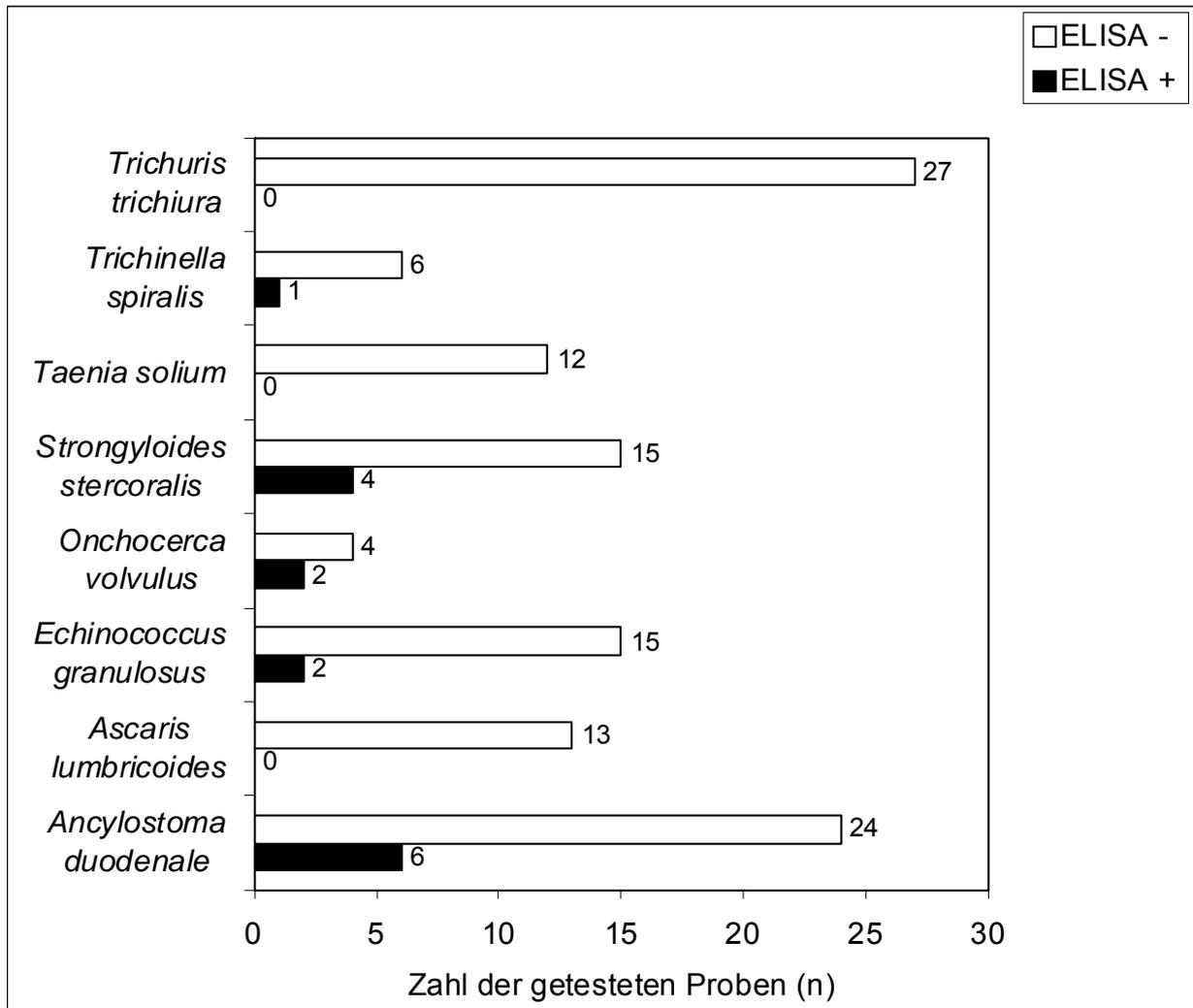


Abbildung 11: Ergebnisse des SEA-ELISA mit Proben von Patienten aus Endemiegebieten mit anderen Helminthosen (n=131)

Im MAMA-ELISA kam es zu Kreuzreaktionen bei *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis*, *Onchocerca volvulus*, *Ascaris lumbricoides* und *Ancylostoma duodenale* (Abb. 12).

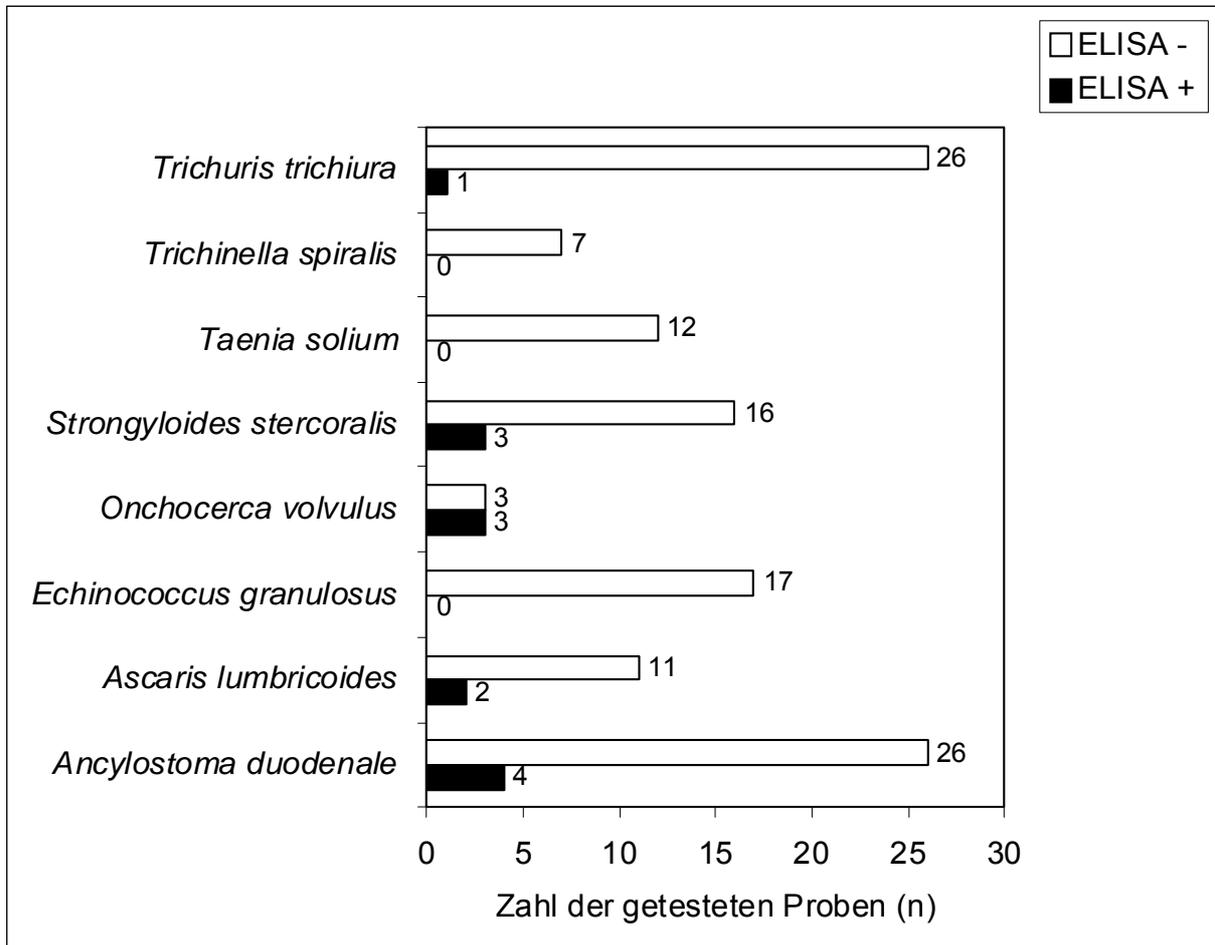


Abbildung 12: Ergebnisse des MAMA-ELISA mit Proben von Patienten aus Endemiegebieten mit anderen Helminthosen (n=131)

#### 4.1.3.4 Ergebnisse der Negativ-Kontrolle

Als Negativ-Kontrolle standen uns 142 Serumproben von Blutspendern des Bayerischen Roten Kreuzes München zur Verfügung. Diese wurden auf SEA- und MAMA-Antigen getestet. Diese fielen sowohl im SEA-ELISA als auch im MAMA-ELISA alle negativ aus.

#### 4.1.4 Darstellung der Sensitivität und Spezifität der einzelnen Patientengruppen im Überblick

In den folgenden Diagrammen ist die Sensitivität und Spezifität der einzelnen Patientengruppen im Vergleich aufgeführt.

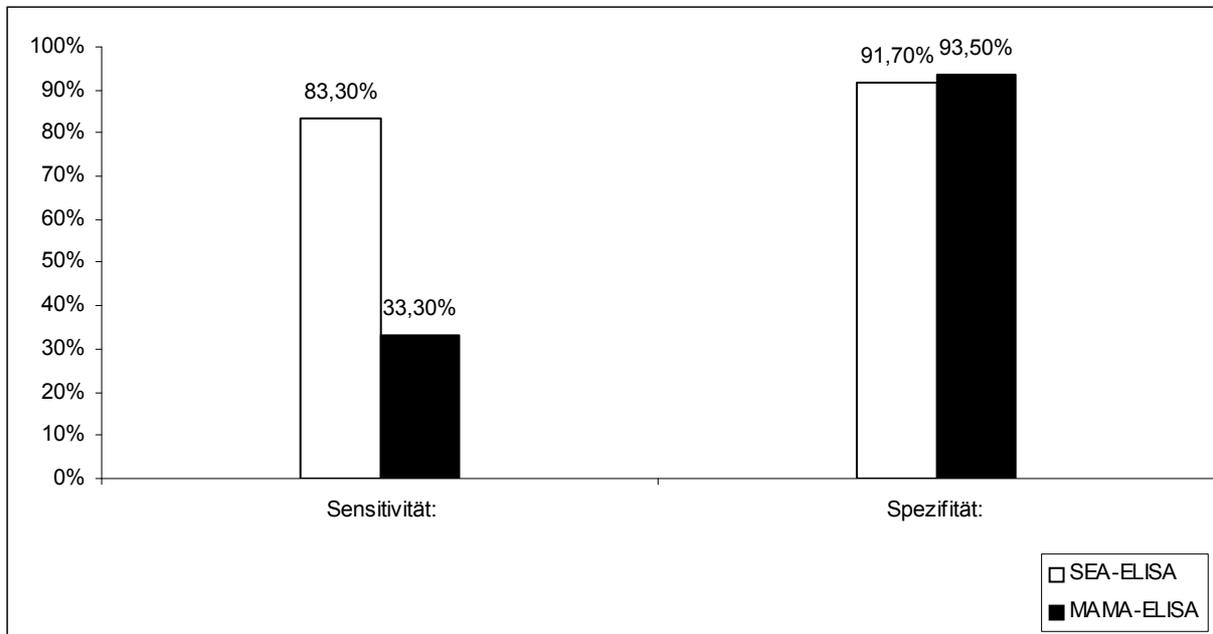


Abbildung 13: Vergleich der Sensitivität und Spezifität von allen Proben der Patienten mit einer Schistosomen-Infektion im SEA- und MAMA-ELISA

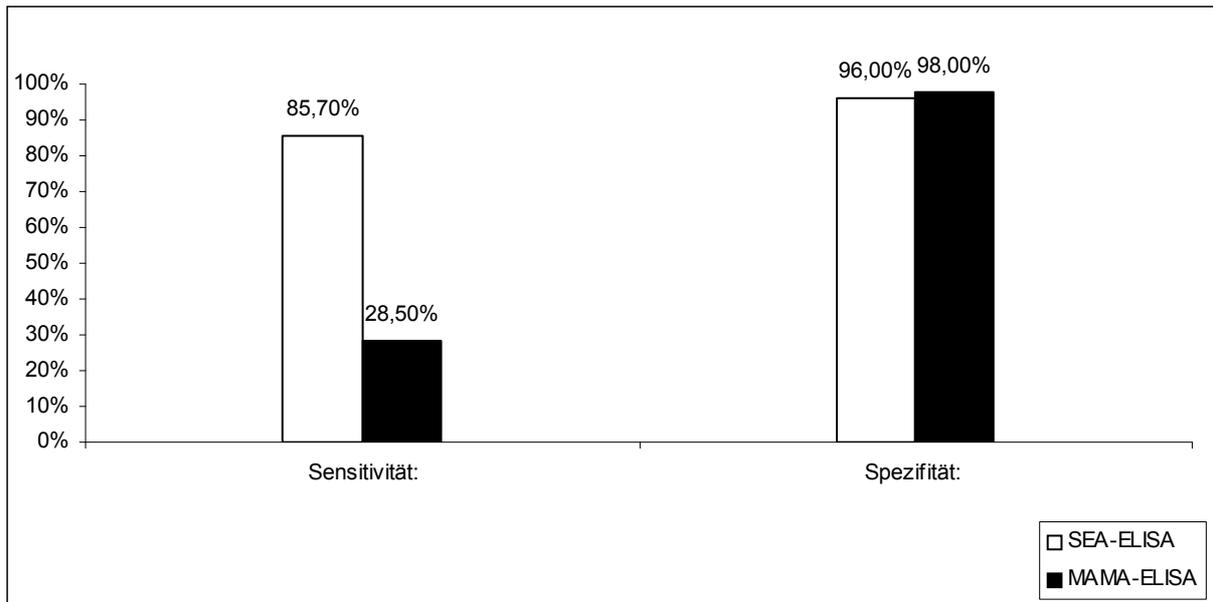


Abbildung 14: Vergleich von Sensitivität und Spezifität im ELISA von Proben deutscher Patienten, die in einem Zeitraum von sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden

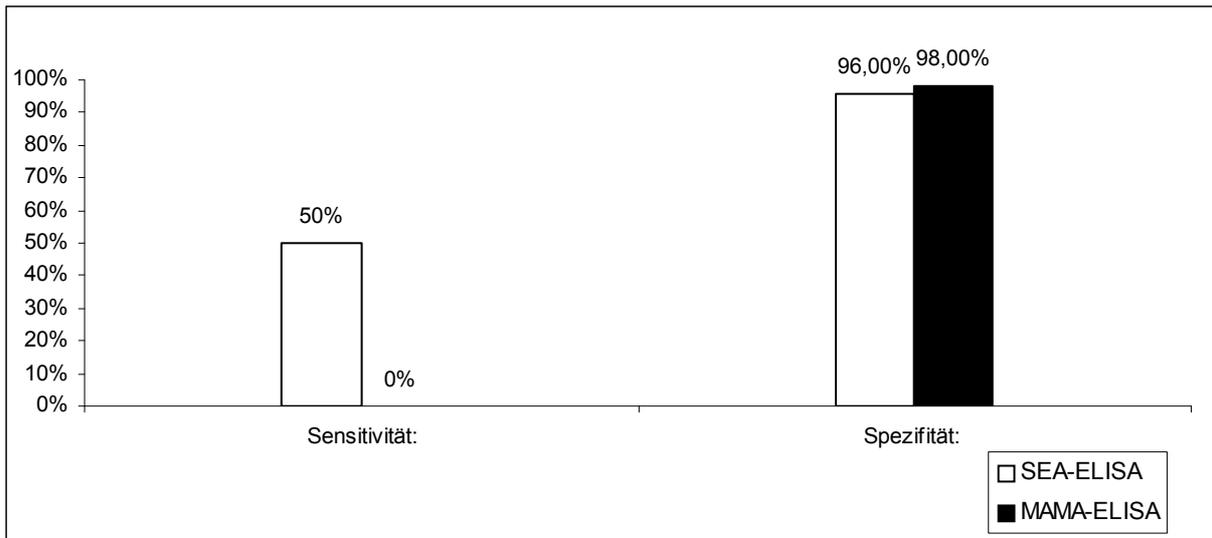


Abbildung 15: Vergleich von Sensitivität und Spezifität im ELISA von Proben deutscher Patienten, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden

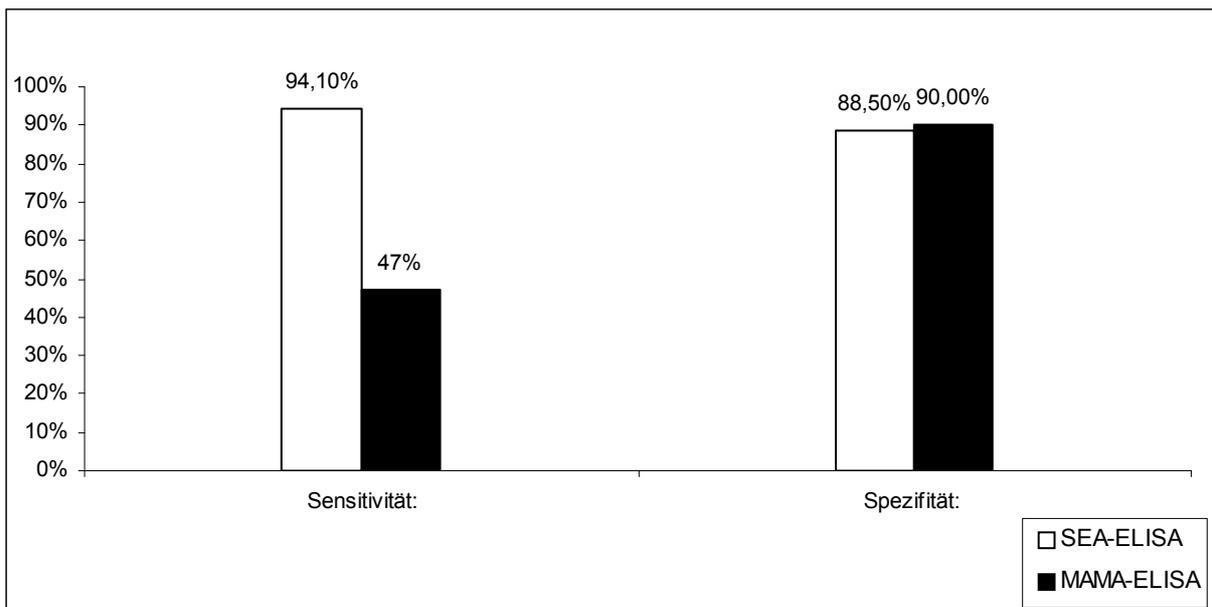


Abbildung 16: Vergleich von Sensitivität und Spezifität im ELISA von Proben von Patienten aus Endemiegebieten, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden

## 4.2 Enzyme-linked Immunoelctrotransfer blot (EITB) (Westernblot)

Im Anschluss an den ELISA testeten wir eine Auswahl von Patientenseren, deren Extinktion im SEA-ELISA deutlich über bzw. knapp unter dem Cut-off Wert lagen, mit Hilfe des Westernblots aus. Als Antigen verwendeten wir ebenfalls zum einen das SEA- und zum anderen das MAMA-Antigen. Die getesteten Seren sind unten im Einzelnen aufgeführt. Die Patienten, die eine Infektion mit Schistosomen aufwiesen, sind wiederum in drei Gruppen aufgeteilt. Zum einen die deutschen Patienten, bei denen die Blutentnahme innerhalb von sechs Monaten lag und zum anderen die deutschen Patienten, bei denen die Infektion mehr als sechs Monate zurücklag. Die dritte Gruppe bilden Patienten aus Endemiegebieten. Weiterhin haben wir Seren von Patienten untersucht, die an anderen Helminthosen erkrankt waren, wobei hier das Patientengut ebenfalls in eine deutsche und eine Gruppe aus einem Endemiegebiet aufgeteilt wurde. Eine Gruppe von Blutspendern des Bayerischen Roten Kreuzes München diente als Negativ-Kontrolle.

- Proben von deutschen Patienten, die in einem Zeitraum von sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden n = 6
- Proben von deutschen Patienten, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden n = 6
- Proben von Patienten aus Endemiegebieten, bei denen die Blutabnahme in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion erfolgte n = 10
- Deutsche Patienten mit anderen Helminthosen n = 8
- Patienten aus Endemiegebieten mit anderen Helminthosen n = 12
- Negativ - Kontrolle n = 16

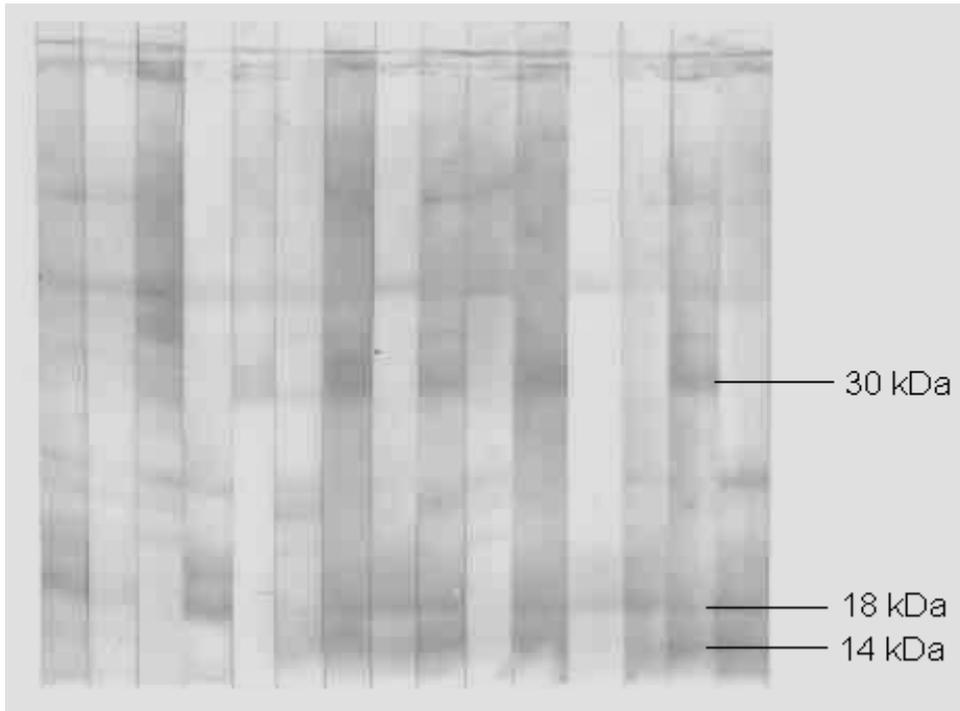


Abbildung 17: EITB-Streifen mit MAMA-Antigen

#### 4.2.1 Ergebnisse des Enzyme-linked Immunoelctrotransfer blot (EITB) und ELISA mit MAMA-Antigen

##### 4.2.1.1 Auswertung der Proben von deutschen Patienten, die in einem Zeitraum von sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden

Tabelle 2: Auswertung der Proben im EITB und ELISA von deutschen Patienten, die in einem Zeitraum von sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden (n=6) (0=negativ, +=positiv)

Serum	30 kDa	18 kDa	14 kDa	SEA-ELISA	MAMA-ELISA
Serum 17	+	+	+	+	0
Serum 21	0	+	+	+	0
Serum 22	+	+	+	+	+
Serum 40	+	+	+	0	0
Serum 71	0	0	0	+	0
Serum 75	0	+	+	+	0

#### 4.2.1.2 Auswertung der Proben von deutschen Patienten, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden

Tabelle 3: Auswertung der Proben im EITB und ELISA von deutschen Patienten, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden (n=6) (0=negativ, +=positiv)

Serum	30 kDa	18 kDa	14 kDa	SEA-ELISA	MAMA-ELISA
Serum 57	0	0	0	0	0
Serum 4 ('95)	0	+	+	0	0
Serum 13	0	0	0	0	0
Serum 1 ('95)	+	+	+	+	0
Serum 10	0	+	+	+	0
Serum 49	0	+	+	+	0

#### 4.2.1.3 Auswertung der Patientenproben aus Endemiegebieten

Tabelle 4: Auswertung der Proben im EITB und ELISA von Patienten aus Endemiegebieten, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden (n=10) (0=negativ, +=positiv)

Serum	30 kDa	18 kDa	14 kDa	SEA-ELISA	MAMA-ELISA
Serum 9	+	+	+	+	+
Serum 29	+	+	+	+	0
Serum 30	0	+	+	+	0
Serum 32	+	+	+	0	0
Serum 37	+	+	+	+	0
Serum 45	+	+	+	+	0
Serum 47	+	+	+	+	0
Serum 48	+	+	+	+	0
Serum WM52	+	+	+	+	+
Serum WM57	+	+	+	0	+

#### 4.2.2 Patienten aufgeteilt nach *S. mansoni*- und *S. haematobium*-Infektionen im EITB

Wir haben untersucht, ob es im EITB Unterschiede bezüglich der Banden gibt, bei Proben von Patienten mit *S. mansoni*-Infektionen und Patienten mit *S. haematobium*-Infektionen. Von den 22 Serumproben hatten 13 Patienten einen Ei-Nachweis von *S. mansoni* und acht Proben konnten einer Infektion mit *S. haematobium* zugeordnet werden. Ein Patient ließ sich nicht sicher der einen oder anderen Erregerart zuordnen, so dass uns hier insgesamt 21 Seren zur Verfügung standen. Wir teilten die Patienten in deutsche Patienten und Patienten aus Endemiegebieten auf. An Seren von deutschen Patienten standen uns elf und Seren von Patienten aus Endemiegebieten standen uns zehn zur Verfügung. Diese Aufteilung erschien uns

sinnvoll, da man bei den Patienten aus den Endemiegebieten davon ausgehen musste, dass diese eventuell Koinfektionen mit *S. mansoni* und *S. haematobium* durchgemacht hatten.

#### 4.2.2.1 Auswertung der getesteten Proben von *S. mansoni*-Patienten im EITB und ELISA

Tabelle 5: Auswertung aller Proben im EITB und ELISA von Patienten mit einer *S. mansoni*-Infektion (n=13) (0=negativ, +=positiv)

Serum	30 kDa	18 kDa	14 kDa	SEA-ELISA	MAMA-ELISA
Serum 17	+	+	+	+	0
Serum 21	0	+	+	+	0
Serum 22	+	+	+	+	+
Serum 40	+	+	+	0	0
Serum 71	0	0	0	+	0
Serum 4 ('95)	0	+	+	0	0
Serum 1 ('95)	+	+	+	+	0
Serum 9	+	+	+	+	+
Serum 29	+	+	+	+	0
Serum 45	+	+	+	+	0
Serum 48	+	+	+	+	0
Serum WM52	+	+	+	+	+
Serum WM57	+	+	+	0	+

#### 4.2.2.2 Auswertung der getesteten Proben von *S. haematobium*-Patienten im EITB und ELISA

Tabelle 6: Auswertung aller Proben im EITB und ELISA von Patienten mit einer *S. haematobium*-Infektion (n=8) (0=negativ, +=positiv)

Serum	30 kDa	18 kDa	14 kDa	SEA-ELISA	MAMA-ELISA
Serum 13	0	0	0	0	0
Serum 10	0	+	+	+	0
Serum 49	0	+	+	+	0
Serum 75	0	+	+	+	0
Serum 30	0	+	+	+	0
Serum 32	+	+	+	0	0
Serum 37	+	+	+	+	0
Serum 47	+	+	+	+	0

#### 4.2.2.3 Auswertung der Proben von deutschen *S. mansoni*-Patienten im EITB und ELISA

Tabelle 7: Auswertung der Proben im EITB und ELISA von Patienten aus Nichtendemiegebieten mit einer *S. mansoni*-Infektion (n=7) (0=negativ, +=positiv)

Serum	30 kDa	18 kDa	14 kDa	SEA-ELISA	MAMA-ELISA
Serum 17	+	+	+	+	0
Serum 21	0	+	+	+	0
Serum 22	+	+	+	+	+
Serum 40	+	+	+	0	0
Serum 71	0	0	0	+	0
Serum 4 ('95)	0	+	+	0	0
Serum 1 ('95)	+	+	+	+	0

#### 4.2.2.4 Auswertung der Proben von deutschen *S. haematobium*-Patienten im EITB und ELISA

Tabelle 8: Auswertung der Proben im EITB und ELISA von Patienten aus Nichtendemiegebieten mit einer *S. haematobium*-Infektion (n=4) (0=negativ, +=positiv)

Serum	30 kDa	18 kDa	14 kDa	SEA-ELISA	MAMA-ELISA
Serum 13	0	0	0	0	0
Serum 10	0	+	+	+	0
Serum 49	0	+	+	+	0
Serum 75	0	+	+	+	0

#### 4.2.2.5 Auswertung der Proben von Patienten aus Endemiegebieten mit einer *S. mansoni*-Infektion im EITB und ELISA

Tabelle 9: Auswertung der Proben im EITB und ELISA von Patienten aus Endemiegebieten mit einer *S. mansoni*-Infektion (n=6) (0=negativ, +=positiv)

Serum	30 kDa	18 kDa	14 kDa	SEA-ELISA	MAMA-ELISA
Serum 9	+	+	+	+	+
Serum 29	+	+	+	+	0
Serum 45	+	+	+	+	0
Serum 48	+	+	+	+	0
Serum WM52	+	+	+	+	+
Serum WM57	+	+	+	0	+

#### 4.2.2.6 Auswertung der Proben von Patienten aus Endemiegebieten mit einer *S. haematobium*-Infektion im EITB und ELISA

Tabelle 10: Auswertung der Proben im EITB und ELISA von Patienten aus Endemiegebieten mit einer *S. haematobium*-Infektion (n=4) (0=negativ, +=positiv)

Serum	30 kDa	18 kDa	14 kDa	SEA-ELISA	MAMA-ELISA
Serum 30	0	+	+	+	0
Serum 32	+	+	+	0	0
Serum 37	+	+	+	+	0
Serum 47	+	+	+	+	0

#### 4.2.3 Patienten mit anderen Helminthosen im EITB und ELISA

##### 4.2.3.1 Auswertung der Proben von Patienten, die nicht aus Endemiegebieten stammen mit anderen Helminthosen

Tabelle 11: Auswertung der Proben im EITB und ELISA von Patienten, die nicht aus Endemiegebieten stammen, mit anderen Helminthosen (n=8) (0=negativ, +=positiv)

Serum	30 kDa	18 kDa	14 kDa	SEA-ELISA	MAMA-ELISA
<i>Trichinella spiralis</i> 1	0	0	0	0	0
<i>Trichinella spiralis</i> . 9	0	0	+	+	0
<i>Trichinella spiralis</i> 11	0	0	0	+	0
<i>Trichinella spiralis</i> 14	0	+	0	0	0
<i>Trichinella spiralis</i> 13	0	0	0	+	0
<i>Taenia solium</i> 95.1472	0	0	0	0	+
<i>Echinococcus granulosus</i> 12	0	0	0	+	0
<i>Trichuris trichiura</i> 6	0	0	0	+	0

#### 4.2.3.2 Auswertung der Proben von Patienten aus Endemiegebieten mit anderen Helminthosen

Tabelle 12: Auswertung der Proben im EITB und ELISA von Patienten aus Endemiegebieten mit anderen Helminthosen (n=12) (0=negativ, +=positiv)

Serum	30 kDa	18 kDa	14 kDa	SEA-ELISA	MAMA-ELISA
<i>Ancylostoma duodenale</i> 34	0	0	0	+	0
<i>Ancylostoma duodenale</i> 11	0	0	0	+	0
<i>Ancylostoma duodenale</i> 32	0	+	+	+	+
<i>Ancylostoma duodenale</i> 37	+	+	+	+	+
<i>Ascaris lumbricoides</i> 2	0	+	+	0	+
<i>Onchocerca volvulus</i> 4	0	+	+	+	+
<i>Onchocerca volvulus</i> 9	0	0	+	0	+
<i>Onchocerca volvulus</i> 10	0	0	+	0	+
<i>Onchocerca volvulus</i> 14	+	+	0	+	0
<i>Strongyloides stercoralis</i> 11	0	+	+	+	+
<i>Strongyloides stercoralis</i> 8	+	0	+	+	0
<i>Strongyloides stercoralis</i> 29	0	+	+	+	0

#### 4.2.4 Auswertung der Negativ-Kontrolle

Tabelle 13: Auswertung der Negativ-Kontrolle im EITB und ELISA (n=16) (0=negativ, +=positiv)

Serum	30 kDa	18 kDa	14 kDa	SEA-ELISA	MAMA-ELISA
Serum 30847	0	0	0	0	0
Serum 30848	0	0	0	0	0
Serum 30849	0	0	0	0	0
Serum 30850	0	0	0	0	0
Serum 30851	0	0	0	0	0
Serum 30855	0	0	+	0	0
Serum 30859	0	0	0	0	0
Serum 30861	0	0	0	0	0
Serum 30862	0	0	0	0	0
Serum 30863	0	0	0	0	0
Serum 30864	0	0	0	0	0
Serum 30865	0	0	0	0	0
Serum 30866	0	0	0	0	0
Serum 30873	0	0	0	0	0
Serum 30874	0	0	0	0	0
Serum 30878	0	0	0	0	0

### **4.3 Enzyme-linked Immunoelctrotransfer blot (EITB) mit SEA-Antigen**

Bei der Auswertung des Westernblots mit SEA-Antigen fiel auf, dass sich eine hohe Anzahl von Banden darstellte, die aber aufgrund des engen Zusammenliegens nicht einzeln hervorgehoben werden konnten. Wir führen das auf das sehr komplexe Proteingemisch des Roh-Antigens zurück.

Wir entschieden uns den Westernblot mit SEA-Antigen aufgrund der schlechten Auswertbarkeit nicht weiterzuführen.

## 5 Diskussion

Der goldene Standard der Diagnostik der Schistosomiasis ist der direkte Ei-Nachweis von Schistosomeneiern im Stuhl, Urinsediment oder in Biopsien. Dieser Nachweis gelingt aber erst nach Ablauf der Präpatenz, also frühestens 4-10 Wochen nach einer Infektion, in einigen Fällen erst nach Monaten bis Jahren. Ein weiterer Schwachpunkt des Ei-Nachweises ist, dass vor allem Patienten mit geringfügiger Infektionsstärke Eier gar nicht oder nur in geringer Menge ausscheiden. Auch nach erfolgreicher medikamentöser Therapie können (avitale) Schistosomen-Eier noch über einen längeren Zeitraum ausgeschieden werden.

Eine gute und bewährte Ergänzung der Diagnostik ist die Immundiagnostik, die häufig den einzigen Hinweis auf eine Infektion liefert. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass hier die Diagnose auch schon vor der Ei-Ausscheidung gestellt werden kann. Es gibt zahlreiche immundiagnostische Tests, die sich in der Methodik und vor allem in der Wahl des Antigens deutlich voneinander unterscheiden. Weiterhin zeigen sich auch deutliche Unterschiede bezüglich der Sensitivität und Spezifität.

Nach Tsang et al. (1983) sollte ein Antigen für den Gebrauch in der Immundiagnostik folgende Eigenschaften aufweisen:

1. Das Antigen sollte unkompliziert in einer ausreichenden Menge herstellbar sein
2. Das Antigen sollte unter einfachen Lagerungsbedingungen stabil sein
3. Das Antigen sollte Komponenten enthalten, die von spezifischen Antikörpern erkannt werden
4. Das Antigen sollte nur minimal kreuzreagieren (z.B. mit anderen Helminthen-Antigenen)
5. Das Antigen sollte mit einem gängigen serologischen Testsystem kompatibel sein, z.B. mit dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) oder dem Enzyme-linked Immunoelctrotransfer blot (EITB)

Tsang et al. verwenden als Antigen für den ELISA bzw. den EITB die mikrosomale Fraktion der adulten *S. mansoni* (MAMA). Die mikrosomale Fraktion ist eine Anreicherung des endoplasmatischen Retikulums und verfügt über die oben aufgeführten Eigenschaften (Tsang et al., 1983). Es kann in einer ausreichend großen Menge hergestellt werden und ist für ca. sechs Monate stabil ohne einen

signifikanten Aktivitätsverlust, wenn es mit Glycerol versetzt wird und in flüssigem Stickstoff oder bei -20°C gelagert wird (Tsang et al., 1983).

### **5.1 Herstellung des MAMA-Antigens**

Wir versuchten, die Immundiagnostik der Schistosomiasis, bei der das lösliche SEA-Antigen im ELISA eingesetzt wird, durch die Einführung des MAMA-Antigens in Anlehnung an die genannte Arbeit von Tsang et al. zu verbessern bzw. zu ergänzen. Bei der Herstellung des Antigens (MAMA) hielten wir uns an die Vorgaben dieser Arbeitsgruppe. Allerdings wurden die Gel-Filtration und Ionen-Austausch-Chromatographie nicht durchgeführt, da es bei der geringen Ausgangsmenge (6,25g) an adulten *S. mansoni* im Vergleich zu Tsang (20g) zu einem zu großen Verlust an Material gekommen wäre.

Zur Herstellung eines ELISA war zu klären, wie viel Rohantigen (adulte *S. mansoni*) nötig ist, um eine sinnvolle Menge an MAMA-Antigen herzustellen. Wir hatten 6,25 g adulte *S. mansoni* verarbeitet und ca. 6 ml MAMA-Antigen gewonnen. Bei einem Proteingehalt von 415 µg/ml und einer Beschichtungskonzentration im ELISA mit 1 µg/ml Coatingpuffer könnte man ca. 80.000 Patientenseren testen. Mit dem EITB könnten ca. 1.000 Patientenseren untersucht werden. Diese Menge an Antigen erschien uns für die Routine-Untersuchungen als ausreichend.

### **5.2 Sensitivität des ELISA**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aussagekraft des ELISA mit MAMA als Antigen untersucht. Zum Vergleich hatten wir die uns zur Verfügung stehenden Serumproben ebenfalls auf SEA-Antigen getestet. Dies wurde nötig, da sich herausstellte, dass die Aktivität der Seren über die Jahre nachlassen kann. Uns standen von 30 Patienten mit gesicherter Schistosomen-Infektion Serumproben zur Verfügung, die im Zeitraum von 1989 bis 1999 in der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München abgenommen worden waren.

Bezüglich der Empfindlichkeit zeigte sich, dass das SEA-Antigen mit einer Sensitivität von 83,3% dem MAMA-Antigen mit 33,3% deutlich überlegen war. Der positive prädiktive Wert, d.h. der Wert, der die Wahrscheinlichkeit angibt, ob eine Erkrankung vorliegt, betrug für das SEA-Antigen 56,8% und für das MAMA-Antigen

lediglich 25%. Der negativ prädiktive Wert lag beim SEA- und beim MAMA-Antigen jeweils bei ca. 97%.

Das bedeutet, dass sich das MAMA-Antigen in unserer Untersuchung zum Nachweis einer Schistosomiasis nicht bewährt hat, da sich die Empfindlichkeit als zu gering erwies. Vergleicht man unsere Ergebnisse mit den Ergebnissen in der Literatur, so kann ein deutlicher Unterschied bezüglich der Sensitivität festgestellt werden. Maddison et al. (1985) erreichten mit MAMA eine Sensitivität von 96%. Tsang et al. führten in der Studie von 1997 eine Sensitivität von 99% auf (Tsang et al., 1997).

Diese Diskrepanz hinsichtlich der Sensitivität könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die Aktivität der zur Verfügung stehenden Patientenserum, die zum Zeitpunkt der Untersuchung zum Teil bis zu fünf Jahre bei -20°C gelagert worden waren, über die Jahre nachgelassen hatte. Weiterhin war es im Rahmen der Routine-Untersuchung und unserer Studie unvermeidbar, dass die Seren für die einzelnen Untersuchungen aufgetaut und zum Teil fraktioniert wieder eingefroren werden mussten. Dieses kann ebenfalls zu einem Aktivitätsverlust der Seren führen. Maddison et al. (1985) und Tsang et al. (1997) machen in ihren Arbeiten keine Angaben über die Lagerungszeit und die Lagerungsbedingungen der Seren.

Ein weiterer Faktor für die geringe Sensitivität in unserer Studie könnte die Tatsache sein, dass wir im Gegensatz zu Tsang et al. (1983) die Gel-Filtration und Ionenaustausch-Chromatographie nicht durchgeführt hatten. Durch die nicht vollendete Reinigung des Antigens könnte es zu einer teilweisen Hemmung bzw. Blockierung der spezifischen Bindungsstellen für Antikörper gekommen sein, die die Sensitivität des MAMA-Antigens negativ beeinflusst.

### **5.3 Sensitivität in Bezug auf die Spezies (*S. mansoni* und *S. haematobium*) und Herkunftsland der Patienten im ELISA**

Maddison et al. (1985) und Al-Sherbiny et al. (1999) zeigten, dass es mit Hilfe der mikrosomalen Fraktion gelingt, innerhalb des Genus der Schistosoma zu unterscheiden. Wir hatten untersucht, ob es bezüglich der Sensitivität Unterschiede, bei den Proben von Patienten gab, bei denen eine *S. mansoni*-Infektion oder eine *S. haematobium*-Infektion vorlag. Von den uns zur Verfügung stehenden 30 Serumproben waren bei 16 Patienten Eier von *S. mansoni* nachgewiesen worden, bei 15 Patienten Eier von *S. haematobium*; eine Probe ließ sich nicht sicher der einen oder anderen Erregerart zuordnen, so dass diese für diese Auswertung nicht

verwendet wurde. Die Sensitivität der Seren mit MAMA-Antigen der 16 *S. mansoni*-Patienten lag bei 43,7%, wohingegen die Sensitivität bei den 13 *S. haematobium*-Patienten bei 30% lag. Mit dem SEA-Antigen erreichten wir eine Sensitivität 87,5% bei den *S. mansoni*-Patienten und 84,6% bei den Seren der *S. haematobium*-Patienten.

Eine Aufteilung in deutsche Patienten und Patienten aus Endemiegebieten erschien uns sinnvoll, da bei letzteren eventuell eine Koinfektion vorlag. Betrachtet man nur die Ergebnisse der Proben von deutschen Patienten, so erzielten wir hier mit dem MAMA-Antigen eine Sensitivität von 25% bei einer Infektion mit *S. mansoni*. Mit einer *S. haematobium*-Infektion reagierte keiner im MAMA-ELISA. Der SEA-ELISA erzielte jeweils eine Sensitivität von 75%. Die Sensitivität des MAMA-Antigens, bei den Proben von den Patienten aus Endemiegebieten, lag bei beiden Gruppen bei 62% und mit dem SEA-Antigen bei jeweils 100%. Von der Tendenz ähneln die Ergebnisse denen von Maddison et al. (1985) und Al-Sherbiny et al. (1999); allerdings fiel auch hier die sehr niedrige Sensitivität des MAMA-Antigens auf. Diese führen wir auf die oben beschriebenen Ursachen zurück.

Maddison et al. (1985) verwendeten einen ELISA und als Antigen die mikrosomale Fraktion von *S. mansoni*. Sie erzielten eine Sensitivität von 96% bei Proben von Patienten mit einer *S. mansoni*-Infektion. Dagegen lag die Sensitivität bei nur 55% bei Patienten, die an einer heterologen Schistosomen-Infektion (*S. haematobium*, *S. japonicum* und *S. mekongi*) erkrankt waren.

Al-Sherbiny et al. (1999) untersuchten Proben von Patienten mit *S. haematobium*-Infektion. Als Antigen benützten sie ebenfalls die mikrosomale Fraktion von *S. mansoni* (MAMA) und zusätzlich die mikrosomale Fraktion von *S. haematobium* (HAMA). Als immundiagnostischer Test diente der FAST<sup>®</sup>-ELISA und der EITB. Die Sensitivität des ELISA lag beim MAMA-Antigen bei nur 83%, gegenüber einer Sensitivität von 98% beim HAMA-Antigen (Abdel-Fattah et al., 2010). Ähnlich verhielten sich die Ergebnisse im Westernblot. Hier wurde im EITB mit MAMA-Antigen lediglich eine Sensitivität von 58% erzielt. Die Sensitivität im EITB mit HAMA als Antigen lag jedoch bei 94% und zeigt eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit bei homologen Schistosomen-Infektionen.

#### 5.4 Spezifität des ELISA

Die Spezifität des MAMA-Antigens ist laut den Untersuchungen von Tsang et al. (1983) höher als die des SEA-Antigens. Seren von Patienten mit anderen Helminthosen, z.B. Paragonimiasis, reagierten in der erwähnten Studie nicht mit dem MAMA-Antigen.

Wir untersuchten, wie es sich mit der Spezifität von MAMA- und SEA-Antigen verhielt. In der Testung mit SEA-Antigen konnten wir eine Spezifität von 91,7% erzielen und mit MAMA eine Spezifität von 93,5%. Mit dem SEA-Antigen traten Kreuzreaktionen mit *Ancylostoma duodenale*, *Echinococcus granulosus*, *Onchocerca volvulus*, *Strongyloides stercoralis*, *Trichinella spiralis* und *Trichuris trichiura* auf. Bei der Testung mit dem MAMA-Antigen kam es zu Kreuzreaktionen mit *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides*, *Echinococcus granulosus*, *Onchocerca volvulus*, *Strongyloides stercoralis*, *Taenia solium* und *Trichuris trichiura*. Auch hier zeigte sich das Problem, dass viele der getesteten Patienten aus Endemiegebieten kamen und somit der Kontakt zu Erregern der Schistosomiasis im Vorfeld sehr wahrscheinlich war. Deshalb teilten wir auch hier die Seren der Patienten in zwei Gruppen ein. Zum einen Patienten aus Deutschland und zum anderen Patienten die aus Endemiegebieten stammen.

Bei den deutschen Patienten zeigte sich nun eine deutlich geringere Anzahl von Kreuzreaktionen. Im SEA-ELISA reagierten drei von 22 Patienten mit einer *Trichinella spiralis*-Infektion und einer von fünf Patienten mit einer *Trichuris trichiura*-Infektion positiv. Bei der Testung mit MAMA-Antigen reagierten diese Patienten nicht. Hier gab es lediglich je ein positives Ergebnis auf *Echinococcus granulosus* und *Taenia solium*. Bei den Patienten aus Endemiegebieten kam es dagegen beim SEA-Antigen zu Kreuzreaktionen mit *Trichinella spiralis*, *Strongyloides stercoralis*, *Onchocerca volvulus*, *Echinococcus granulosus* und *Ancylostoma duodenale* und bei MAMA mit *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis*, *Onchocerca volvulus*, *Ascaris lumbricoides* und *Ancylostoma duodenale*.

Beschränkt man sich bei der Beurteilung der Ergebnisse auf die deutschen Patienten, so fällt auf, dass es mit der Testung auf MAMA-Antigen zu deutlich weniger Kreuzreaktionen kam und es außerdem gelang, Kreuzreaktionen mit *Trichinella spiralis* und *Trichuris trichiura* auszuschließen.

## 5.5 Antikörpertiter im Verlauf

Wilkins et al. (1991) konnten bei Rhesusaffen, die mit *S. mansoni* infiziert wurden, den Antikörper-Titer im Verlauf darstellen. Als diagnostischer Test wurde der FAST<sup>®</sup>-ELISA eingesetzt. Es zeigte sich ein Anstieg der Antikörper IgM, IgA, IgE, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> und IgG<sub>4</sub> nach der Infektion mit Zerkarien von *S. mansoni*. Nach der Behandlung mit Praziquantel kam es zu einem deutlichen Abfall der Antikörper-Titer, während bei den Affen die nicht behandelt worden waren, ein weiterer Anstieg der Antikörper erfolgte. Im Tiermodell eignete sich MAMA als Antigen zum Nachweis einer akuten oder chronischen Infektion und zur Überprüfung des Therapieerfolgs nach medikamentöser Behandlung. Anders verhielten sich die Antikörper, die gegen die Eier der Schistosomen gerichtet sind. Diese sind erst im fortgeschrittenen Krankheitsstadium nachweisbar und blieben auch nach Therapiebeginn über Monate erhöht (Hillyer et al., 1979; Mott et al., 1982).

Wir wollten klären, ob es gelingt, im ELISA mit MAMA-Antigen einen Antikörperanstieg nach einer Infektion bzw. einen Antikörperabfall nach Therapiebeginn beim Menschen nachzuweisen.

Die Patienten wurden wieder in zwei Gruppen untersucht; zuerst Patienten mit möglichem Schistosomen-Kontakt in der Kindheit. Diese Gruppe eignete sich also nicht dazu, einen Antikörperanstieg nach einer frischen Infektion zu bestimmen. Um eine frische Infektion mittels MAMA nachweisen zu können, wählten wir deutsche Patienten aus, die sich lediglich im Urlaub oder während einer Berufsreise in Endemiegebieten aufgehalten hatten, bei denen also eine lang zurückliegende Infektion anamnestisch ausgeschlossen werden konnte. Diese Gruppe wurde nochmals unterteilt in solche Patienten, bei denen der wahrscheinliche Infektionszeitpunkt weniger als sechs Monate und solche, bei denen mehr als sechs Monate zurücklag. Da bei diesen Patienten zum Zeitpunkt der Entnahme der Serumproben eine Schistosomen-Infektion durch den Ei-Nachweis in Stuhl, Urin oder Biopsat bereits gesichert war, ihr Infektionsverlauf also jenseits der Präpatenzperiode von gewöhnlich vier bis zehn Wochen lag, konnten wir den von Wilkins et al. (1991) im Tierversuch beschriebenen Antikörperanstieg beim Menschen nicht nachweisen. Wir können also keine Aussage darüber machen, ob sich das MAMA-Antigen für die Frühdiagnose während der Präpatenzzeit eignet.

Ein weiteres Problem stellte sich in dem Versuch, den Verlauf des Antikörpertiters nach Therapiebeginn darzustellen, da bei den Patienten keine regelmäßigen Blutentnahmen zur Verlaufskontrolle des Titers erfolgten. Serumproben wurden nach der Diagnosestellung bzw. nach Therapiebeginn nicht bei allen Patienten abgenommen, oder der Zeitraum zwischen den einzelnen Abnahmen war sehr lang, zum Teil Monate bis Jahre. Aufgrund dieser Tatsache konnten wir keine Aussage über den Verlauf des Antikörpertiters nach Therapiebeginn machen.

## **5.6 Enzyme-linked Immunoelctrotransfer blot (EITB)**

Weiterhin untersuchten wir, wie es sich mit dem MAMA- und SEA-Antigen im Enzyme-linked Immunoelctrotransfer blot (EITB) verhielt. Mit dem EITB prüften wir eine Auswahl an Patientenseren, deren Extinktion im SEA-ELISA deutlich über bzw. knapp unter dem Cut-off Wert lag.

Im Westernblot mit SEA-Antigen ließen sich keine eindeutigen Banden hervorheben. Dies beruht auf der Tatsache, dass es sich bei dem SEA-Antigen um ein Rohantigen handelt. Hier wird eine große Anzahl von Proteinen aufgetrennt, so dass einzelne Banden nicht isoliert dargestellt werden konnten.

Zur Austestung des EITB mit dem MAMA-Antigen prüften wir Seren von Patienten aus Deutschland und solche aus Endemiegebieten. Bei der Auswertung der Ergebnisse fielen drei Banden auf. Diese lagen im Bereich von 30, 18 und 14 kDa. Bei den Serumproben der deutschen Patientengruppe traten die Banden 18 und 14 bei neun von 12 Patienten auf. Vier Patienten reagierten im Bereich aller drei beschriebenen Banden. Mit dem MAMA-ELISA erfassten wir nur einen Patienten. Von den zehn getesteten Patientenseren aus Endemiegebieten reagierten neun positiv im Bereich der drei Banden. Alle Seren zeigten die Banden 18 und 14 kDa. Im MAMA-ELISA wurden lediglich drei Patienten erfasst.

Tsang et al. (1984) beschrieben Banden im Bereich von 16 bis 29 kDa und größer als 40 kDa. Drei Banden wurden besonders hervorgehoben. Sie lagen im Bereich von 16,4 kDa, 18,4 kDa und 29,0 kDa. Hier zeigte sich also tendenziell eine Übereinstimmung in unseren Ergebnissen. In der Arbeit von Tsang et al. (1997) wurde die Sensitivität im MAMA-EITB mit 97% angegeben. Die Spezifität lag sogar bei 100%.

Auch beim EITB untersuchten wir, ob es Unterschiede bezüglich der Banden-Verteilung bei Patienten mit einer *S. mansoni*-Infektion oder einer *S. haematobium*-

Infektion gab. Von den 22 Proben von Patienten mit einer Schistosomen-Infektion konnten 13 Proben einer *S. mansoni*- und acht Proben einer *S. haematobium*-Infektion zugeordnet werden. Eine Probe ließ sich nicht eindeutig zuordnen, so dass wir diese in die Bewertung nicht aufnehmen konnten. Auch hier teilten wir die Proben in solche von deutschen Patienten und von Patienten aus Endemiegebieten auf. Es sollte ebenfalls eine eventuelle Koinfektion ausgeschlossen werden.

Betrachtet man die Bandenverteilung der gesamten Probengruppe, so zeigt sich, dass die Banden 14 und 18 kDa bei *S. mansoni* in 12 von 13 Fällen auftraten und bei *S. haematobium* in sieben von acht Proben nachgewiesen werden konnten. Ein deutlicher Unterschied zeigte sich in der Verteilung der Bande 30 kDa. Hier reagierten die Proben der Patienten mit einer *S. mansoni*-Infektion in zehn von 13 Fällen positiv, dagegen war die Bande 30 kDa bei den Proben von *S. haematobium* nur in drei von acht Fällen nachweisbar. Der MAMA-ELISA erfasste vier von den Patienten mit einer *S. mansoni*-Infektion. Bei den Patienten mit einer *S. haematobium*-Infektion wurde keine der Proben erfasst.

Bei der deutschen Patientengruppe fiel auf, dass bei den *S. mansoni*-Patienten vier von sieben im Bereich von 30 kDa eine Bande aufwies und bei den *S. haematobium*-Patienten keine 30 kDa Bande nachzuweisen war. Beide Gruppen reagierten bis auf eine Probe positiv im Bereich 14 und 18 kDa. Bei den Proben der Patienten aus Endemiegebieten reagierten alle Proben im Bereich 14 und 18 kDa. Die Bande 30 kDa konnte in nur einem Fall nicht nachgewiesen werden.

Die deutsche Patientengruppe zeigte die Bande 30 kDa gehäuft bei den Proben mit nachgewiesener *S. mansoni*-Infektion. Diese Beobachtung deckte sich mit den Ergebnissen von Tsang et al. (1997). Hier wurden als Antigene für den EITB die mikrosomalen Fraktionen MAMA (*S. mansoni*), HAMA (*S. haematobium*) und JAMA (*S. japonicum*) verwendet. Als spezifische Banden wurden für MAMA 30 kDa, für HAMA 23 kDa und für JAMA 18, 23 und 29 kDa angegeben.

Die Seren von Patienten, die nicht aus Endemiegebieten stammten, bei denen andere Helminthosen nachgewiesen wurden und die falsch positiv im SEA- und MAMA-ELISA reagiert hatten, zeigten weder die oben beschriebene Zweier- noch die Dreier-Konstellation der Banden. Lediglich zwei Patienten mit einer *Trichinella spiralis*-Infektion wiesen die Bande 18 kDa bzw. die Bande 14 kDa auf.

Bei den Patienten mit anderen Helminthosen aus Endemiegebieten sahen wir nur einmal die Dreier-Konstellation der Banden. Sechs der 12 Patienten reagierten im

Bereich 18 und 14 kDa. Wir vermuten bei dieser Gruppe aufgrund der Herkunftsländer, dass es schon in der Kindheit zu einem Kontakt mit Schistosomen gekommen sein muss.

## 5.7 Schlussfolgerungen

Der MAMA-ELISA war in unserer Untersuchung zu wenig sensitiv, was unserer Meinung nach auf die Aktivitätsabnahme der Seren bei langer Lagerung zurückzuführen ist. Eventuell erzielt man eine höhere Sensitivität, indem man als ergänzende Reinigungsschritte bei der Herstellung des Antigens die Gel-Filtration und die Ionen-Austausch-Chromatographie einsetzt. Bezüglich der Sensitivität war der SEA-ELISA deutlich überlegen, so dass wir diesen Test weiterhin als immundiagnostisches Mittel der Wahl einsetzen.

Allerdings zeigte das MAMA-Antigen durchgehend eine höhere Spezifität. Besonders deutlich war dies im MAMA-EITB. Keines der getesteten Seren von Patienten, die aus Deutschland stammen und bei denen andere Helminthosen nachgewiesen wurden, reagierte in der oben beschriebenen Zweier- oder Dreier-Konstellation. Dieser Test würde sich auf der einen Seite anbieten, Seren von Patienten zu überprüfen, die im SEA-ELISA positiv reagiert haben, bei denen aber Klinik und Anamnese eine Schistosomen-Infektion eher ausschließen. Auf der anderen Seite weist der MAMA-EITB drei Banden auf, die bei Patienten mit dem Verdacht auf eine Schistosomen-Infektion diese Diagnose untermauern könnten. Der EITB bietet sich vor allem als Bestätigungstest bei Patienten an, die klinisch und anamnestisch den Verdacht auf eine Schistosomen-Infektion bieten, mit dem SEA-ELISA aber nicht erfasst wurden. Um hier jedoch ein aussagekräftiges Ergebnis bezüglich der Sensitivität und Spezifität zu bekommen, muss eine ausreichende Anzahl von Patientenseren im Anschluss an diese Arbeit untersucht werden.

Im SEA-EITB stellten sich keine eindeutigen Banden dar, so dass wir diesen Test für die Diagnostik nicht für sinnvoll halten.

Bezüglich der Sensitivität des MAMA-Antigens innerhalb des Genus der Schistosoma, zeigte sich, dass die Proben von Patienten mit einer Infektion durch *S. mansoni* häufiger im ELISA reagierten als die Proben von Patienten mit einer *S. haematobium*-Infektion. Auch im EITB fanden wir eine ähnliche Verteilung. Um im EITB jedoch ein aussagekräftiges Ergebnis zu erzielen, müsste eine größere Zahl von Patienten untersucht werden.

Die Darstellung des Antikörperverlaufs mit dem MAMA-ELISA beim Menschen nach einer Infektion bzw. nach Therapiebeginn gelang aus den oben genannten Gründen nicht. Hier wäre es sinnvoll, von Patienten, bei denen anamnestisch oder klinisch der Verdacht einer Infektion vorliegt, in regelmäßigen Abständen Blutproben zu entnehmen. Dies sollte in der Präpatenzzeit und nach Therapiebeginn erfolgen, um einen Antikörper-Anstieg nach einer frischen Infektion bzw. einen Antikörper-Abfall nach Therapiebeginn nachweisen zu können.

Die Aufbereitung des MAMA-Antigens und die gewonnene Menge an Rohantigen für die Routine-Untersuchung erschien uns als praktikabel und ausreichend.

## 6 Zusammenfassung

Die Schistosomiasis (Bilharziose) ist eine der wichtigsten Tropenerkrankungen und die weltweit bedeutsamste Wurminfektion. Die aus den aquatischen Zwischenwirtsschnecken freigesetzten Gabelschwanzlarven (Zerkarien) dringen über die Haut ein und können initial ein akutes fieberhaftes Krankheitsbild (Katayama-Syndrom) verursachen. Wesentlich bedeutsamer sind jedoch die chronischen Stadien mit einer chronisch granulomatösen Entzündung zahlreicher betroffener Organe (Urogenitaltrakt, Darm, Leber, Milz, Lunge, Gehirn u.a.). Die Pathogenese der chronischen Stadien wird durch die Immunreaktion auf die von den adulten Würmern abgelegten Eier bestimmt. Zur Verhinderung der häufig irreversiblen Spätschäden ist eine möglichst frühzeitige Diagnose und Therapie erforderlich.

Nach Ablauf der Präpatenz, das heißt frühestens 6 bis 10 Wochen nach der Infektion, ist der parasitologische Nachweis von Eiern im Stuhl, Urin und in Biopsaten möglich. Die parasitologische Diagnostik hat jedoch eine begrenzte Sensitivität und erfordert relativ aufwändige Anreicherungsverfahren und/oder eine invasive Materialgewinnung. Ein Einachweis gelingt vor allem bei schwächerer Infektionslast oft nicht. In einem Teil der Fälle liegt trotz hoher Infektionsintensität nur eine intermittierende Ausscheidung vor oder eine nachweisbare Ausscheidung bleibt aus, da aufgrund einer besonders ausgeprägten, granulomatösen Immunreaktion die meisten Eier im Gewebe verbleiben (sog. ‚geschlossene‘ Schistosomiasis).

Die Labordiagnose durch immundiagnostische Methoden ist nicht nur während der chronischen Infektionsstadien möglich, sondern schon in der Präpatenzzeit und dann oft der einzige diagnostische Hinweis auf eine Schistosomiasis.

Es gibt zahlreiche immundiagnostische Tests, die vor allem durch die Wahl der verwendeten Antigene deutliche Unterschiede bezüglich Sensitivität und Spezifität aufweisen. Verwendet werden verschiedene ungereingte und gereinigte Antigene von Eiern, Adulten und Zerkarien der verschiedenen Schistosomenarten. Tsang et al. (1997) benutzten für die Immundiagnostik der Schistosomiasis den Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und den Enzyme-linked Immuno-electrotransfer blot (EITB). Als Antigen wurde die mikrosomale Fraktion (MAMA), eine Anreicherung des endoplasmatischen Retikulums der Adulten von *Schistosoma mansoni*, verwendet. Diesem Antigen wurde eine hohe Sensitivität und Spezifität zugeschrieben. In

Tiermodellen gelang es Wilkins et al., einen Antikörper-Anstieg nach der Infektion bzw. -Abfall nach Therapiebeginn zu zeigen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die bestehende Immundiagnostik, bei der meist lösliche Eiantigene (SEA, soluble egg-Antigen) von *S. mansoni* verwendet werden, mit der Verwendung des mikrosomalen Adultwurm-Antigens von *S. mansoni* (MAMA-Antigen) zu vergleichen.

Als immundiagnostische Testverfahren wurden ELISA und EITB (Immunoblot) verwendet. Für die Validierung standen insgesamt 403 Seren zur Verfügung: 30 Seren von Patienten mit einer parasitologisch gesicherten Schistosomen-Infektion, 231 Seren von Patienten mit anderen Helminthiasen und 142 Negativ-Kontrollseren von deutschen Blutspendern.

Die Sensitivität des MAMA-Antigens im ELISA lag mit nur 33,3% deutlich unter der des SEA-Antigens im ELISA (83,3%). Dabei reagierten Proben von Patienten mit einer homologen Infektion (*S. mansoni*) im MAMA-ELISA häufiger positiv als die Proben von Patienten mit einer *S. haematobium*-Infektion.

Die Spezifität des SEA-ELISA betrug 91,7%, die des MAMA-ELISA 93,5%. Im SEA-ELISA kam es bei den Proben von deutschen Patienten mit *Trichinella spiralis*- und mit *Trichuris trichiura*-Infektion zu Kreuzreaktionen. Bei der Testung mit MAMA-Antigen gab es lediglich Kreuzreaktionen im Serum eines Patienten mit einer larvalen *Echinococcus granulosus*-Infektion (zystische Echinokokkose) und eines Patienten mit einer larvalen *Taenia solium*-Infektion (Zystizerkose). Mit dem MAMA-Antigen kam es also deutlich seltener zu Kreuzreaktionen als mit dem SEA-Antigen.

Weiterhin wurden MAMA- und SEA-Antigen im EITB getestet. Im SEA-EITB ließen sich keine einzelnen Banden isoliert darstellen. Im MAMA-EITB fielen drei Banden mit einem Molekulargewicht von 30, 18 und 14 kDa auf und zeigen eine weitgehende Übereinstimmung mit den von Tsang et al. beschriebenen Banden von 29, 18 und 16 kDa.

Zudem wurde untersucht, ob es diskriminierende Banden bei Patienten mit einer *S. mansoni*-Infektion oder einer *S. haematobium*-Infektion gibt. Bei den Proben der deutschen Patienten mit einer *S. mansoni*-Infektion fiel ein gehäuftes Auftreten der 30 kDa Bande auf. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Tsang et al., die diese als Spezies-diskriminierende Bande angaben.

Die Spezifität des MAMA-EITB betrug, getestet an Seren deutscher Patienten mit anderen Helminthosen, 100%; es ließ sich also keine der oben erwähnten Banden in

dieser Gruppe nachweisen. Dagegen waren zahlreiche Kreuzreaktionen in Seren von Patienten zu beobachten, die aus Endemiegebieten stammten und mit anderen Helminthen infiziert waren. Dies ist am ehesten mit einer früher durchgemachten oder einer noch bestehenden aber nicht parasitologisch nachgewiesenen Schistosomiasis bei dieser Patientengruppe zu erklären.

Die Ergebnisse zeigen, dass der MAMA-ELISA zu wenig sensitiv ist. Hier war der SEA-ELISA deutlich überlegen, so dass dieser für die serologische Screening-Diagnostik der Schistosomiasis besser geeignet ist. Allerdings zeigte das MAMA-Antigen im ELISA und insbesondere im EITB eine wesentlich höhere Spezifität als das SEA-Antigen. Somit bietet sich der MAMA-EITB als spezifischer Bestätigungstest an. Auch eine serologische Diskriminierung der Spezies *S. mansoni* und *S. haematobium* ist mit dem MAMA-EITB möglich.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BIS	NN'-Methylenbisacrylamid
BSA	Bovine Serum Albumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAA	Circulating anodic antigen
CCA	Circulating cathodic antigen
CEF 6	Cationic egg fraction 6
cm	Zentimeter
CT	Computertomogramm
DDIA	dipstick dye immunoassay
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic-acid
EITB	Enzyme-linked Immunoelctrotransfer blot (EITB) =Immunoblot =Westernblot
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)
Fa.	Firma
FAST	Falcon Assay Screening Test®
FSF I	Fibroblasten-stimulierenden Faktor I
g	Gramm
HAMA	Schistosoma haematobium mikrosomales Antigen
HCl	Wasserstoffchlorid
HEPES	Hydroxyethyl piperazinyl ethanesulfonic acid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
IFN-γ	Interferon-gamma
IFT	Indirekte Fluoreszenz-Test
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgG <sub>1</sub>	Immunglobulin G <sub>1</sub>
IgG <sub>2</sub>	Immunglobulin G <sub>2</sub>
IgG <sub>3</sub>	Immunglobulin G <sub>3</sub>
IgG <sub>4</sub>	Immunglobulin G <sub>4</sub>
IgM	Immunglobulin M
IHA	Indirekte Hämaglutination
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5
IL-10	Interleukin-10
IL-13	Interleukin-13
JAMA	Schistosoma japonicum mikrosomales Antigen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KLH	keyhole limpet haemocyanin
l	Liter

LMW	Low Molecular Weight-Marker
m	Meter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mA	Milliampere
MAMA	Schistosoma mansoni mikrosomales Antigen
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRT	Kernspintomogramm
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMRI	Naval Medical Research Institute
OPD	o-Phenylenediamine
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PER	Ammoniumpersulfat
pH	pondus hydrogenii (Wasserstoffionenkonzentration)
rpm	rotations per minute
RP26	26 kDa recombinant protein
s	Sekunde
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat
SDS-PAGE	Natrium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
SEA	Soluble egg antigen
SM	<i>Schistosoma mansoni</i>
SMP	Sodium metaperiodate
sog.	sogenannt
SWAP	Soluble Schistosoma mansoni adult worm antigen preparation
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-β	Transforming growth factor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	und andere
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
x g	Formelzeichen für die Erdbeschleunigung ( $g=9,81 \text{ m/s}^2$ )
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Schistosomen-Pärchens (Mehlhorn et al. 1983)	2
Abbildung 2: Entwicklungszyklus von <i>Schistosoma mansoni</i> nach Piekarski, 1973	6
Abbildung 3: Verbreitung von <i>Schistosoma mansoni</i> und <i>Schistosoma intercalatum</i> nach Löscher et al., 2000	10
Abbildung 4: Verbreitung von <i>Schistosoma haematobium</i> , <i>Schistosoma japonicum</i> und <i>Schistosoma mekongi</i> nach Löscher et al., 2000	10
Abbildung 5: Ergebnisse des SEA-ELISA im Überblick	59
Abbildung 6: Ergebnisse des MAMA-ELISA im Überblick	59
Abbildung 7: Ergebnisse des SEA-ELISA mit Proben von Patienten mit nachgewiesenen anderen Helminthosen	64
Abbildung 8: Ergebnisse des MAMA-ELISA mit Proben von Patienten mit nachgewiesenen anderen Helminthosen	65
Abbildung 9: Ergebnisse des SEA-ELISA mit Proben von Patienten aus Nichtendemiegebieten mit anderen Helminthosen	66
Abbildung 10: Ergebnisse des MAMA-ELISA mit Proben von Patienten aus Nichtendemiegebieten mit anderen Helminthosen	67
Abbildung 11: Ergebnisse des SEA-ELISA mit Proben von Patienten aus Endemiegebieten mit anderen Helminthosen	68
Abbildung 12: Ergebnisse des MAMA-ELISA mit Proben von Patienten aus Endemiegebieten mit anderen Helminthosen	69
Abbildung 13: Vergleich der Sensitivität und Spezifität von allen Proben der Patienten mit einer Schistosomen-Infektion im SEA- und MAMA-ELISA	70
Abbildung 14: Vergleich von Sensitivität und Spezifität im ELISA von Proben deutscher Patienten, die in einem Zeitraum von sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden	70
Abbildung 15: Vergleich von Sensitivität und Spezifität im ELISA von Proben deutscher Patienten, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden	71
Abbildung 16: Vergleich von Sensitivität und Spezifität im ELISA von Proben von Patienten aus Endemiegebieten, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden	71



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Morphologische Merkmale der humanpathogenen Schistosomenarten (Löscher et al., 2000)	3
Tabelle 2: Auswertung der Proben im EITB und ELISA von deutschen Patienten, die in einem Zeitraum von sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden	73
Tabelle 3: Auswertung der Proben im EITB und ELISA von deutschen Patienten, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden	74
Tabelle 4: Auswertung der Proben im EITB und ELISA von Patienten aus Endemiegebieten, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten nach der Infektion abgenommen wurden	74
Tabelle 5: Auswertung aller Proben im EITB und ELISA von Patienten mit einer <i>S.</i> <i>mansoni</i> -Infektion	75
Tabelle 6: Auswertung aller Proben im EITB und ELISA von Patienten mit einer <i>S.</i> <i>haematobium</i> -Infektion	75
Tabelle 7: Auswertung der Proben im EITB und ELISA von Patienten aus Nichtendemiegebieten mit einer <i>S. mansoni</i> -Infektion	76
Tabelle 8: Auswertung der Proben im EITB und ELISA von Patienten aus Nichtendemiegebieten mit einer <i>S. haematobium</i> -Infektion	76
Tabelle 9: Auswertung der Proben im EITB und ELISA von Patienten aus Endemiegebieten mit einer <i>S. mansoni</i> -Infektion	76
Tabelle 10: Auswertung der Proben im EITB und ELISA von Patienten aus Endemiegebieten mit einer <i>S. haematobium</i> -Infektion	77
Tabelle 11: Auswertung der Proben im EITB und ELISA von Patienten, die nicht aus Endemiegebieten stammen, mit anderen Helminthosen	77
Tabelle 12: Auswertung der Proben im EITB und ELISA von Patienten aus Endemiegebieten mit anderen Helminthosen	78
Tabelle 13: Auswertung der Negativ-Kontrolle im EITB und ELISA	78

## 9 Literaturverzeichnis

Abdel-Fattah M, Al-Sherbiny M, Osman A, Charmy R, Tsang V. Improving the detection limit of quantitative diagnosis of anti-S. haematobium antibodies using Falcon Assay Screening Test (FAST) ELISA by developing a new standard curve. *Parasitol Res.* 2010; 108:1457-63

Abdel-Rahim IM, Kaiser C, Homeida M, Elsheikh M, Schmidt E, Ehrich JH, Doehring-Schwerdfeger E. Enzyme activities and protein concentrations in serum of patients with hepatosplenic schistosomiasis. *Trop Med Parasitol* 1990; 41: 262-4

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: 403-8

Abou-Basha LM, Shehab AY, Abdel-Fattah M, Bassili A. Performance of IgG avidity in an area endemic for schistosomiasis in Egypt. *East Mediterr Health J.* 2002; 8: 172-80

Alarcón de Noya B, Colmenares C, Lanz H, Caracciolo MA, Losada S, Noya O. *Schistosoma mansoni*: immunodiagnosis is improved by sodium metaperiodate which reduces cross-reactivity due to glycosylated epitopes of soluble egg antigen. *Exp Parasitol* 2000; 95: 106-12

Al-Kraida A, Giangreco A, Shaikh MU, Al-Shehri A. Appendicitis and schistosomiasis. *Br J Surg* 1988; 75: 58-9

Al-Sherbiny MM, Osman AM, Hancock K, Deelder AM, Tsang VC. Application of immunodiagnostic assays: detection of antibodies and circulating antigens in human schistosomiasis and correlation with clinical findings. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 960-6

Beck L, Van-Lüme DS, Souza JR, Domingues AL, Favre T, Abath FG, Montenegro SM. Discriminating acute from chronic human schistosomiasis mansoni. *Acta Trop.* 2008; 108: 229-33

Beck L, Van-Lüme DS, Souza JR, Morais CN, Melo WG, Xavier E, Barbosa CS, Aroucha ML, Domingues AL, Favre T, Pieri O, Abath FG, Montenegro SM. Evaluation of tests based on the antibody response to keyhole limpet haemocyanin and soluble egg antigen to differentiate acute and chronic human schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99: 97-8

Bergquist NR. Immundiagnosis of Schistosomiasis 1-8. In: Bergquist NR. (Ed) Immunodiagnostic approaches in Schistosomiasis. John Wiley & Sons, Chichester 1992

Bierman WF, Wetsteyn JC, van Gool T. Presentation and diagnosis of imported schistosomiasis: relevance of eosinophilia, microscopy for ova, and serology. *J Travel Med.* 2005; 12: 9-13

Bottieau E, Clerinx J, de Vega MR, Van den Enden E, Colebunders R, Van Esbroeck M, Vervoort T, Van Gompel A, Van den Ende J. Imported Katayama fever: clinical and biological features at presentation and during treatment. *J Infect.* 2006; 52: 339-45

Bou A, Gascon J, Eugenia Valls M, Corachan M. Katayama fever in Spanish tourists: analysis of 25 cases. *Med Clin (Barc)* 2001; 116: 220-2

Bout D, Rousseaux R, Carlier Y, Capron A. Kinetics of classes and sub-classes of total immunoglobulins and specific antibodies to *Schistosoma mansoni* during murine infection. *Parasitology* 1980; 80: 247-56

Bretzel G, Tannich E. Labordiagnostik 994-1019. In: Löscher T, Burchard GD. (Hrsg.) *Tropenmedizin in Klinik und Praxis mit Reise- und Migrationsmedizin.* Thieme, Stuttgart-New York 2010

Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LF, Silveira AM, Oliveira RC, Gazzinelli G. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop.* 2008; 108: 109-17

Cetron MS, Chitsulo L, Sullivan JJ, Pilcher J, Wilson M, Noh J, Tsang VC, Hightower AW, Addiss DG. Schistosomiasis in Lake Malawi. *Lancet* 1996; 348: 1274-8

Chen MG, Fu S. Schistosomiasis japonica 452-7. In: Goldsmith R, Heyneman D. (Eds) *Tropical Medicine and Parasitology*. Appleton & Lange, Norwalk 1989

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

Cline BL. Schistosomiasis mansoni 434-45. In: Goldsmith R, Heyneman D. (Eds) *Tropical Medicine and Parasitology*. Appleton & Lange, Norwalk 1989

Davis A. Schistosomiasis 1413-56 In: Cook GC (Ed) *Manson's Tropical Diseases*. Saunders, London 1996

De Jesus AR, Silva A, Santana LB, Magalhaes A, de Jesus AA, de Almeida RP, Rego MA, Burattini MN, Pearce EJ, Carvalho EM. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *J Infect Dis* 2002; 185: 98-105

De Jonge N, Gryseels B, Hilberath GW, Polderman AM, Deelder AM. Detection of circulating anodic antigen by ELISA for seroepidemiology of schistosomiasis mansoni. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82: 591-4

De Jonge N. Detection of the Circulating Anodic Antigen for Immunodiagnosis of Schistosoma Infections 111-24. In: Bergquist NR (Ed) *Immunodiagnostic approaches in Schistosomiasis*. John Wiley & Sons, Chichester 1992

Deelder AM, De Jonge N, Boerman OC, Fillie YE, Hilberath GW, Rotmans JP, Gerritse MJ, Schut DW. Sensitive determination of circulating anodic antigen in *Schistosoma mansoni* infected individuals by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40: 268-72

Doenhoff MJ, Butterworth AE, Hayes RJ, Sturrock RF, Ouma JH, Koech D, Prentice M, Bain J. Seroepidemiology and serodiagnosis of schistosomiasis in Kenya using crude and purified egg antigens of *Schistosoma mansoni* in ELISA. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87: 42-8

Eckert J. Helminthen 560-8. In: Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. (Hrsg.) *Medizinische Mikrobiologie*. Thieme, Stuttgart-New York 1998

El-Masry NA, Farid Z, Bassily S, Kilpatrick ME, Watten RH. Schistosomal colonic polyposis: clinical, radiological and parasitological study. *J Trop Med Hyg* 1986; 89: 13-7

Farid Z. Schistosomiasis haematobia 445-52. In: Goldsmith R, Heyneman D. (Eds) *Tropical Medicine and Parasitology*. Appleton & Lange, Norwalk 1989

Forth W. Anthelminthika 706-16. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K. (Hrsg.) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Spektrum, Heidelberg; Berlin; Oxford 1996

Ghandour AM, Tricker K, Doenhoff MJ, al-Robai AA, Banaja AA. An enzyme-linked immunosorbent assay using *Schistosoma mansoni* purified egg antigen for the diagnosis of schistosomiasis in Saudi Arabia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91: 287-9

Gonzalez E. Schistosomiasis, cercarial dermatitis, and marine dermatitis. *Dermatol Clin* 1989; 7: 291-300

Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet*. 2006; 368: 1106-18

Hempelmann E, Kaminsky R. Long term stability of colors after silver staining. *Electrophoresis* 1986; 7: 481

Hempelmann E. Analytische SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-Page) 427-31. In: Peters J, Baumgarten H (Hrsg.) *Monoklonale Antikörper*. Springer, Berlin 1984

Hillyer GV, Ruiz Tiben E, Knight WB, Gomez de Rios I, Pelley RP. Immunodiagnosis of infection with *Schistosoma mansoni*: comparison of ELISA, radioimmunoassay, and precipitation tests performed with antigens from eggs. *Am J Trop Med Hyg* 1979; 28: 661-9

Idris MA, Ruppel A. Diagnostic Mr31/32,000 *Schistosoma mansoni* proteins (Sm31/32): Reaction with sera from Sudanese patients infected with *S. mansoni* or *S. haematobium*. *J Helminthol* 1988; 62: 95-101

Istre GR, Fontaine RE, Tarr J, Hopkins RS. Acute schistosomiasis among Americans rafting the Omo River, Ethiopia. *JAMA* 1984; 251: 508-10

Jassim A, Hassan K, Catty D. Antibody isotypes in human schistosomiasis mansoni. *Parasite Immunol*. 1987; 9: 627-50

Jauréguiberry S, Paris L, Caumes E. Acute schistosomiasis, a diagnostic and therapeutic challenge. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16: 225-31

Jelinek T, Nothdurft HD, Löscher T. Schistosomiasis in Travelers and Expatriates. *J Travel Med* 1996; 3: 160-4

Junker J, Eckardt L, Husstedt I. Cervical intramedullar schistosomiasis as a rare cause of acute tetraparesis. *Clin Neurol Neurosurg* 2001; 103: 39-42

Kuntz RE. Other Schistosomiasis 456-7. In: Goldsmith R, Heyneman D. (Eds) Tropical Medicine and Parasitology. Appleton & Lange, Norwalk 1989

Lambertucci JR. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010 Jul; 105: 422-35

Leutscher P, Raharisolo C, Pecarrere JL, Ravaoalimalala VE, Serieye J, Rasendramino M, Vennervald B, Feldmeier H, Esterre P. Schistosoma haematobium induced lesions in the female genital tract in a village in Madagascar. Acta Trop 1997; 66: 27-33

Li Y, Ross AG, Li Y, He YK, Luo XS, McManus DP. Serological diagnosis of Schistosoma japonicum infections in China. Trans R Soc Trop Med Hyg 1997; 91: 19-21

Li YL, Idris MA, Corachan M, Han JJ, Kirschfink M, Ruppel A. Circulating antigens in schistosomiasis: detection of 31/32-kDa proteins in sera from patients infected with Schistosoma japonicum, S. mansoni, S. haematobium, or S. intercalatum. Parasitol Res 1996; 82: 14-8

Lier T, Simonsen GS, Haaheim H, Hjelmevoll SO, Vennervald BJ, Johansen MV: Novel real-time PCR for detection of Schistosoma japonicum in stool. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2006; 37: 257-64

Löscher T, Eichenlaub S, Seitz HM. Tropenmedizinisch-parasitologische Labordiagnostik 641-63. In: Lang W, Löscher T (Hrsg.) Tropenmedizin in Klinik und Praxis. Thieme, Stuttgart-New York 2000

Löscher T, Ruppel A, Schubert S. Schistosomiasis (Bilharziose) und andere Trematodeninfektionen 101-24. In: Lang W, Löscher T. (Hrsg.) Tropenmedizin in Klinik und Praxis. Thieme, Stuttgart-New York 2000

Maddison SE, Slemenda SB, Tsang VC, Pollard RA. Serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* with microsomal adult worm antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay using a standard curve developed with a reference serum pool. *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34: 484-94

Maddison SE. The present status of serodiagnosis and seroepidemiology of schistosomiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1987; 7: 93-105

Mahmoud AAF, Farid Abdel Wahab M. Schistosomiasis 458-73. In: Warren KS, Mahmoud AAF (Eds) *Tropical and Geographical Medicine*. Mc Graw-Hill 1990

Mahmoud AAF. Schistosomiasis: an overview. *Immunol Invest* 1992; 21: 383-90

Makarova E, Goes TS, Marcatto AL, Leite MF, Goes AM. Serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis using *Schistosoma mansoni* recombinant protein RP26. *Parasitol Int*. 2003; 52: 269-79

Mehlhorn H, Eichenlaub D, Löscher T, Peters W (Hrsg). *Diagnostik und Therapie der Parasitosen des Menschen*, Gustav Fischer, Stuttgart-Jena-New York 1995

Mehlhorn H, Peters W (Hrsg). *Diagnose der Parasiten des Menschen*, Gustav Fischer, Stuttgart-New York 1983

Mehlhorn, H., *Parasitology in focus*. Springer, Berlin 1988

Mott KE, Dixon H. Collaborative study on antigens for immunodiagnosis of schistosomiasis. *Bull World Health Organ*. 1982; 60: 729-53

Ohnishi ST, Barr JK. A simplified method of quantitating protein using the biuret and phenol reagents. *Anal Biochem* 1978; 86: 193-200

Osment LS. Update: seabather's eruption and swimmer's itch. *Cutis* 1976; 18: 545-7

Piekarski G. Medizinische Parasitologie in Tafeln, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1973

Poggensee G, Feldmeier H. Female genital schistosomiasis: facts and hypotheses. *Acta Trop* 2001; 79: 193-210

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: 652-56

Richter J, Ruppel A. Schistosomiasis oder Bilharziose 676-705. In: Löscher T, Burchard GD. (Hrsg.) Tropenmedizin in Klinik und Praxis mit Reise- und Migrationsmedizin. Thieme, Stuttgart-New York 2010

Schafer TW, Hale BR. Gastrointestinal complications of schistosomiasis. *Curr Gastroenterol Rep* 2001; 3: 293-303

Schneider M, Gehrke S, Nothdurft HD, Stremmel W. Grippaler Infekt und Lebererkrankung nach Tropenaufenthalt. *Dtsch Med Wochenschr* 1999; 124: 1127-30

Schwartz E, Kozarsky P, Wilson M, Cetron M. Schistosome infection among river rafters on Omo River, Ethiopia. *J Travel Med.* 2005; 12: 3-8.

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: 411-25

Tawfeek GM, Hameed DM, el-Hoseiny LM. Avidity of immunoglobulin G antibody response to the different antigenic fractions of soluble *Schistosoma mansoni* adult worm antigen preparation (SWAP) using avidity immunoblotting assay. *J Egypt Soc Parasitol.* 2004 Aug; 34: 543-58

Teesdale CH, Amin MA. Comparison of the Bell technique, a modified Kato thick smear technique, and a digestion method for the field diagnosis of schistosomiasis mansoni. *J Helminthol* 1976; 50: 17-20

ten Hove RJ, Verweij JJ, Vereecken K, Polman K, Dieye L, van Lieshout L: 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: 179-85

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 4350-4

Tsang VC, Hancock K, Kelly MA, Wilson BC, Maddison SE. *Schistosoma mansoni* adult microsomal antigens, a serologic reagent. II. Specificity of antibody responses to the *S. mansoni* microsomal antigen (MAMA). *J Immunol* 1983; 130: 1366-70

Tsang VC, Hancock K, Maddison SE, Beatty AL, Moss DM. Demonstration of species-specific and cross-reactive components of the adult microsomal antigens from *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* (MAMA and JAMA). *J Immunol* 1984; 132: 2607-13

Tsang VC, Peralta JM, Simons AR. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 1983; 92: 377-91

Tsang VC, Tsang KR, Hancock K, Kelly MA, Wilson BC, Maddison SE. *Schistosoma mansoni* adult microsomal antigens, a serologic reagent. I. Systematic fractionation, quantitation, and characterization of antigenic components. *J Immunol* 1983; 130: 1359-65

Tsang VC, Wilkins PP. Immunodiagnosis of schistosomiasis. *Immunol Invest* 1997; 26: 175-88

Valli LC, Kanamura HY, Da Silva RM, Ribeiro-Rodrigues R, Dietze R. Schistosomiasis mansoni: immunoblot analysis to diagnose and differentiate recent and chronic infection. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 302-7

van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S, Looman CW, Nagelkerke NJ, Habbema JD, Engels D. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Tropica*, 2003, 86: 125-39

Van Lieshout L, de Jonge N, Bassily S, Mansour MM, Deelder AM. Assessment of cure in schistosomiasis patients after chemotherapy with praziquantel by quantitation of circulating anodic antigen (CAA) in urine. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44: 323-8

Van Lieshout L, Polderman AM, Deelder AM. Immunodiagnosis of schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA and CCA, in particular in individuals with recent or light infections. *Acta Trop* 2000; 77: 69-80

Vogel H, Mohr W. Durch Helminthen verursachte Krankheiten 37-52. In: Mohr W, Schumacher HH, Weyer F. (Hrsg.) *Lehrbuch der Tropenkrankheiten*. Thieme, Stuttgart 1975

Weinstock JV. The pathogenesis of granulomatous inflammation and organ injury in schistosomiasis: interactions between the schistosome ova and the host. *Immunol Invest* 1992; 21: 455-75

WHO: Report of the WHO informal consultation on schistosomiasis control. Geneva 1998; 1-45

WHO: Schistosomiasis - Number of people treated, 2008. *Weekly Epidem Rec* 2010; 85: 158-64

Wichmann D, Panning M, Quack T, Kramme S, Burchard GD, Grevelding C, Drosten C. Diagnosing schistosomiasis by detection of cell-free parasite DNA in human plasma. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3: e422

Wiest, PM. The Epidemiology of Morbidity of Schistosomiasis. *Parasitology Today* 1996; 12: 215-20

Wilkins PP, Maddison SE, Slemenda SB, Tsang VC. Isotypic analysis of humoral immune responses in rhesus monkeys to an adult microsomal antigen of *Schistosoma mansoni*: an indicator of successful treatment. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45: 629-35

Wilson M, Sulzer AJ, Walls KW. Modified antigens in the indirect immunofluorescence test for schistosomiasis. *Am J Trop Med Hyg* 1974; 23: 1072-6

Zhu Y, He W, Liang Y, Xu M, Yu C, Hua W, Chao G. Development of a rapid, simple dipstick dye immunoassay for schistosomiasis diagnosis. *J Immunol Methods* 2002; 266: 1-5

Zuidema PJ. The Katayama syndrome; an outbreak in Dutch tourists to the Omo National Park, Ethiopia. *Trop Geogr Med* 1981; 33: 30-5

## **10 Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität in München angefertigt. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. Rösel des BRK Blutspendendienstes möchte ich für die Überlassung der Serumproben danken.

Frau Dr. S. Eichenlaub danke ich sehr herzlich für die Anleitung, die immer freundliche Unterstützung und Geduld in allen Phasen der Arbeit.

Ausdrücklich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Th. Löscher für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.