

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

**Epidemiologisches Screening auf Schistoma
haematobium/mansoni DNA und Leishmania spp. Kinetoplasten-
DNA im Blut ghanaischer HIV-Patient(inn)en**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Franziska Johanna Weinreich
aus Donaueschingen

Hamburg 2023

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 22.01.2025**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Malte Kohns Vasconcelos

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Ralf Hagen

Inhaltsverzeichnis

1. Originalarbeit der Publikationspromotion	
1.1. Originalartikel	4
2. Zusammenfassende Darstellung der Publikation	
2.1. Einleitung	15
2.1.1. Leishmaniasis	16
2.1.2. Schistosomiasis	17
2.2. Material und Methoden	18
2.2.1. Studienpopulation	18
2.2.2. Diagnostisches Verfahren	18
2.2.3. Statistische Auswertung	21
2.2.4. Ethik	21
2.3. Ergebnisse	22
2.4. Diskussion	23
3. Zusammenfassung	
3.1. Deutsche Zusammenfassung	25
3.2. Englische Zusammenfassung	25
4. Abkürzungsverzeichnis	26
5. Literaturverzeichnis	27
6. Erklärung des Eigenanteils	33
7. Danksagung	34
8. Lebenslauf	35
9. Eidesstattliche Erklärung	36



Article

Screening for *Schistosoma* spp. and *Leishmania* spp. DNA in Serum of Ghanaian Patients with Acquired Immunodeficiency

Franziska Weinreich ¹, Felix Weinreich ¹, Andreas Hahn ², Ralf Matthias Hagen ³, Holger Rohde ⁴, Fred Stephen Sarfo ^{5,6}, Torsten Feldt ⁷, Albert Dompreeh ⁸, Shadrack Osei Asibey ⁶, Richard Boateng ⁸, Hagen Frickmann ^{1,2} and Kirsten Alexandra Eberhardt ^{9,10,*}

¹ Department of Microbiology and Hospital Hygiene, Bundeswehr Hospital Hamburg, 20359 Hamburg, Germany; franziskaweinreich@bundeswehr.org (F.W.); felixweinreich@bundeswehr.org (F.W.); frickmann@bnitm.de (H.F.)

² Department of Medical Microbiology, Virology and Hygiene, University Medicine Rostock, 18057 Rostock, Germany; andreas.hahn@uni-rostock.de

³ Department of Microbiology and Hospital Hygiene, Bundeswehr Central Hospital Koblenz, 56070 Koblenz, Germany; ralfmatthiashagen@bundeswehr.org

⁴ Institute of Medical Microbiology, Virology and Hygiene, University Medical Center Hamburg-Eppendorf (UKE), 20251 Hamburg, Germany; rohde@uke.de

⁵ Department of Medicine, Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi 00233, Ghana; fsarfo.chs@knust.edu.gh

⁶ Department of Medicine, Komfo Anokye Teaching Hospital, Kumasi 00233, Ghana; shakosbey19@gmail.com

⁷ Department of Gastroenterology, Hepatology and Infectious Diseases, University Medical Center Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany; Torsten.Feldt@med.uni-duesseldorf.de

⁸ Department of Clinical Microbiology, Komfo Anokye Teaching Hospital, Kumasi 00233, Ghana; adompreeh@gmail.com (A.D.); richardboateng166@gmail.com (R.B.)

⁹ Department of Tropical Medicine, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine & I. Department of Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20359 Hamburg, Germany

¹⁰ Division of Hygiene and Infectious Diseases, Institute of Hygiene and Environment, 20539 Hamburg, DE

* Correspondence: keberhardt@bnitm.de; Tel.: +49-40-42818-0

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Weinreich, F.; Weinreich, F.; Hahn, A.; Hagen, R.M.; Rohde, H.; Sarfo, F.S.; Feldt, T.; Dompreeh, A.; Asibey, S.O.; Boateng, R.; et al.

Screening for *Schistosoma* spp. and *Leishmania* spp. DNA in Serum of Ghanaian Patients with Acquired

Immunodeficiency. *Pathogens* 2022, 11, 760.

<https://doi.org/10.3390/pathogens11070760>

Academic Editors: Silvana Belo, Ana Afonso, Pedro Ferreira and Fernanda de Freitas Anibal

Received: 31 May 2022

Accepted: 28 June 2022

Published: 2 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Both *Schistosoma* spp. (species) and *Leishmania* spp. are prevalent in Ghana in West Africa. However, little is known about their local occurrence in immunocompromised individuals. In the study presented here, the real-time PCR-(polymerase chain reaction-)based screening for repetitive DNA (deoxyribonucleotide acid) sequences from the genomes of *Leishmania* (*L.*) spp. and *Schistosoma* (*S.*) spp. was performed in the serum of HIV-(human immunodeficiency virus-)infected Ghanaian patients. In 1083 assessed serum samples from HIV-positive and HIV-negative Ghanaian patients, *Leishmania* spp.-specific DNA was not detected, while the diagnostic accuracy-adjusted prevalence estimation suggested a 3.6% prevalence of the *S. mansoni* complex and a 0.5% prevalence of the *S. haematobium* complex. Associations of schistosomiasis with younger age, as well as with the male sex, could be shown but not with an HIV status. Weakly significant signals for the associations of schistosomiasis with an increased viral load, reduced CD4+ (CD = cluster of differentiation) T cell count, and a reduced CD4+/CD8+ ratio could be observed but was inconsistently lost in the case of the stratification on the species complex level. So, it is concluded that factors other than HIV status are more likely to have influenced the occurrence of *Schistosoma* spp. infections in the assessed Ghanaian patients. Potential associations between HIV infection-associated factors, such as the viral load and the immune status of the patients, for which weak signals were observed in this hypothesis-forming retrospective assessment, should be confirmed by prospective, sufficiently powered investigations.

Keywords: schistosomiasis; leishmaniasis; HIV; Ghana; epidemiology; molecular diagnosis

1. Introduction

Both *Leishmania* (*L.*) species (spp.) and *Schistosoma* (*S.*) spp. are eukaryotic parasitic pathogens associated with human diseases prevalent in Ghana. Cutaneous leishmaniasis, in particular, has been described as prevalent in the Ghanaian Ho Municipality in the Volta Region as well as in the Oti Region and the Taviefe community [1–8]. The *Leishmania enriettii* complex could be isolated from the cutaneous lesions of patients from the Ho District [9], while *L. major* and *L. tropica* have been detected in Ghanaian sand flies [10]. The host competence of local rodents and their role in the transmission cycle of *Leishmania* spp. in Ghana is a matter of ongoing academic debate [11]. Although associations between HIV (human immunodeficiency virus) infections and leishmaniasis are considered as well established [12,13], associations between cutaneous leishmaniasis in Ghana and HIV infections are so far poorly characterized.

Focusing on schistosomiasis, both urogenital schistosomiasis, caused by *Schistosoma haematobium* [14–26], and intestinal schistosomiasis, caused by *S. mansoni* [27–29], are common in Ghana regionally, even with high rates of co-infection with both species [27,29]. Preschool-aged children and school children are affected [30–34] with urogenital schistosomiasis-associated macrohematuria and eosinophilia [35,36]. Seasonal effects exist; in detail, infection rates with *Schistosoma* spp. have been reported to be increased in the rainy season in Ghana [37], and access to safe water sources has been identified as a critical preventive factor [38–42] next to health education, teaching, and training [43,44]. However, educated awareness cannot compensate for lacking resources required for self-protection [21]. Of note, the increased prevalence of schistosomiasis in Ghana was associated with the construction of freshwater dams [45,46].

Similar to leishmaniasis, little is known so far on the epidemiology of schistosomiasis in Ghanaian HIV patients. In a previous assessment by the Komfo Anokye Teaching Hospital in Kumasi, Ghana, a low prevalence of *Schistosoma mansoni* infections within the minor one-digit percent range was recorded in patients with HIV, although an overall increase in the proportion of the intestinal parasite carriage with enteric parasites other than *Schistosoma* spp. compared to HIV-negative individuals was reported [47]. Another study detected increased co-incidence rates of urogenital schistosomiasis and sexually transmitted infections in Ghana [48], but without particular focus on HIV, calling for respective assessments.

For both visceral leishmaniasis and schistosomiasis, real-time PCR (polymerase chain reaction) from the human serum targeting multicopy DNA sequences of the pathogens has been described as a credible diagnostic procedure. For *Leishmania* spp., in particular, real-time PCR targeting kinetoplast DNA (kDNA, DNA = deoxyribonucleotide acid) has been found to be particularly reliable in a recent comparative test assessment [49]. Multicopy target sequences with proven suitability for the diagnosis of schistosomiasis from the patients' serum comprise *Sm1-7* for the *Schistosoma mansoni* complex and *Dra1* for the *Schistosoma haematobium* complex, respectively, for which a multiplex real-time PCR assay has recently been successfully validated with samples from travel returnees and migrants [50]. Of note, when applied with samples from a Madagascan high endemicity setting for *S. mansoni*, the *Sm1-7* assay proved considerably higher sensitivity compared to the alternative but less repetitive multicopy target ITS2 (internal transcribed spacer) [51].

In this study, sera from Ghanaian HIV-infected patients and a small control group of sera from Ghanaians without HIV were subjected to a real-time PCR-based screening for *Leishmania* spp. [49] and *Schistosoma* spp. [50,51]. Considering the fact that only cutaneous leishmaniasis is known from Ghana [1–11] and the applied *Leishmania* spp.-specific kDNA-PCR assay [49] has been evaluated for visceral leishmaniasis only, the *Leishmania* spp. screening has to be considered experimental. Thereby, it was speculated that immunosuppression associated with an increased replication of the leishmaniae, which cause cutaneous disease, might be associated with a sufficient amount of pathogen DNA in patient sera to be measurable in peripheral serum as well but without evidence for this assumption. Pathogen findings and the recorded cycle threshold (Ct) values within this screening approach were tested for a correlation with the immunological status of the patients. By doing so, the exploratory, hypothesis-forming study intended to contribute to a better understanding of the epidemiology of leishmaniasis and schistosomiasis in

Ghanaian HIV patients. One underlying hypothesis was that HIV infection-associated immunosuppression might lead to an increased immunotolerance against parasitic infections and thus to an increased detection rate of freely circulating parasite DNA in the peripheral blood of the patients. In line with this, a higher *Schistosoma* spp. infection intensity was found to be correlated with HIV infection in a Tanzanian assessment [52]. Also, previous evidence suggests that *Schistosoma* spp. infections, particularly in the case of urogenital schistosomiasis, increase the risk of HIV acquisition, as shown in Tanzania, Uganda, and Zimbabwe [53–55], while HIV infections do not seem to be independent risk factors for the acquisition of schistosomiasis [56,57].

2. Results

2.1. Qualitative and Quantitative PCR Results

From 1083 assessed serum samples, four samples had to be excluded from the further assessment due to PCR inhibition, resulting in 1079 included samples. A total of thirty-six (3.4%) samples tested positive for the *S. mansoni* complex and five (0.5%) for the *S. haematobium* complex. Leishmanial DNA was not detected. Applying the known diagnostic accuracy estimations [50] for the *S. mansoni* complex PCR (sensitivity: 0.959, specificity: 0.973) and the *S. haematobium* complex PCR (sensitivity: 0.933, specificity: 1) for the calculation of the diagnostic accuracy-adjusted prevalence conducting the Rogan&Gladden/Gart&Buck prevalence estimator as described recently [58–60], adjusted prevalence values of 3.6% for the *S. mansoni* complex and 0.5% for the *S. haematobium* complex were estimated. A semi-quantitative assessment of the recorded cycle threshold (Ct) values resulted in a mean value of 31.6 (standard deviation SD: 2.2, minimum: 24.1, maximum: 35.7) for the *S. mansoni* complex and a mean value of 31.6 (SD: 1.4, minimum: 30.1, maximum: 34.1) for the *S. haematobium* complex.

2.2. Associations of PCR Positivity with Age, Sex, and HIV Status

Younger age was associated with positive PCR results for *Schistosoma* spp. on the genus level as well as for the *S. haematobium* complex but not with positive PCR results for the *S. mansoni* complex. Associations between infections and sex could be shown for *Schistosoma* spp. on the genus level, as well as for the *S. mansoni* complex with a higher infection rate in the male sex, but not for the *S. haematobium* complex. With all *Schistosoma mansoni* complex infections occurring in HIV-positive patients, there was a weak significance for an association between *S. mansoni* complex infections and HIV positivity. However, such links were neither detectable for the *S. haematobium* complex nor *Schistosoma* spp. on the genus level. The details are provided in Table 1.

Table 1. Associations of *Schistosoma* spp. with age, sex, and HIV (human immunodeficiency virus) status of the cohort. Significance was calculated by applying a student's *t*-test and Fisher's two-sided exact test. Above each assessed parameter, the numbers of cases and percentages are given, for which the respective parameter was recorded. The total numbers, *n*, differ from 1079 due to partly incomplete datasets. *p*-values ≤ 0.05 were considered as indicators of statistical significance of differences between the compared groups.

	<i>S. mansoni</i> Positive	<i>S. mansoni</i> Negative	<i>p</i> -Value	<i>S. haematobium</i> Positive	<i>S. haematobium</i> Negative	<i>p</i> -Value	<i>S. mansoni</i> and/or <i>S. haematobium</i> Positive	<i>S. mansoni</i> and/or <i>S. haematobium</i> Negative	<i>p</i> -Value
<i>n</i> (%)	36 (3.4)	1014 (96.6)		5 (0.5)	1045 (99.5)		41 (3.9)	1009 (96.1)	
Age in years \pm SD	37.1 \pm 7.2	39.6 \pm 10.0	0.1432	27.2 \pm 4.8	39.6 \pm 9.9	0.0040	35.9 \pm 7.7	39.7 \pm 10.0	0.0165
<i>n</i> (%)	36 (3.4)	1015 (96.6)		5 (0.5)	1046 (99.5)		41 (3.9)	1010 (96.1)	
Male, <i>n</i> (%)	17 (47.22)	245 (24.14)	0.003	2 (40.00)	260 (24.86)	0.603	19 (46.34)	243 (24.06)	0.003
<i>n</i> (%)	36 (3.4)	1036 (96.6)		5 (0.5)	1067 (99.5)		41 (3.8)	1031 (96.2)	
HIV positive, <i>n</i> (%)	36 (100.00)	933 (90.06)	0.042	3 (60.00)	966 (90.53)	0.075	39 (95.12)	930 (90.20)	0.420

n = number; SD = standard deviation.

2.3. Associations of PCR Positivity with HIV Viral Load, CD4+ (CD = Cluster of Differentiation) T Cell Count, and CD4+/CD8+ Ratio

PCR positivity for *Schistosoma* spp. on the genus level, as well as for the *S. haematobium* complex but not for the *S. mansoni* complex, was weakly associated with a higher HIV viral load. Associations of reduced CD4+ T cell counts with PCR positivity for *Schistosoma* spp. on the genus level, for the *S. mansoni* complex, and for the *S. haematobium* complex were observed. Finally, a lower CD4+/CD8+ ratio was associated with the positivity of PCR for the *Schistosoma haematobium* complex spp., while the calculated weak significance was lost on the genus level and for the *S. mansoni* complex. The details are provided in Table 2.

Table 2. Associations of *Schistosoma* spp. (species) with the HIV (human immunodeficiency virus) viral load, CD 4+ (CD = cluster of differentiation) T cell count, and CD4+/CD8+ ratio of the HIV positive patients. Significance was calculated by applying the Wilcoxon rank-sum (Mann–Whitney) testing. Above each assessed parameter, the number of cases and percentages are given, for which the respective parameter was recorded. *p*-values ≤ 0.05 were considered as indicators of statistical significance of the differences between the compared groups.

	S. mansoni Positive	S. mansoni Negative	p-Value	S. haematobium Positive	S. haematobium Negative	p-Value	S. mansoni and/or S. haematobium Positive	S. mansoni and/or S. haematobium Negative	p-Value
<i>n</i> (%)	35 (3.8)	886 (96.2)		3 (0.3)	918 (99.7)		38 (4.1)	883 (95.9)	
CD4+ T cell count/ μ L, median (IQR)	280.0 (69.0-397.0)	398.0 (196.0-623.0)	0.0017	47.0 (8.0-66.0)	392.5 (189.0-610.0)	0.0094	244.0 (58.0-392.0)	398.0 (197.5-629.0)	0.0002
<i>n</i> (%)	27 (4.2)	622 (95.8)		0.1	0.4		30 (4.6)	619 (95.4)	
CD4+/CD8+ T cell ratio, median (IQR)	0.30 (0.17-0.81)	0.42 (0.21-0.75)	0.3277	(0.0-0.1)	(0.2-0.7)	0.013	0.25 (0.14-0.50)	0.42 (0.21-0.75)	0.0837
<i>n</i> (%)	34 (3.9)	841 (96.1)		3 (0.3)	872 (99.7)		37 (4.2)	838 (95.8)	
Viral load, log ₁₀ copies/mL, median (IQR)	4.8 (2.0-5.5)	3.9 (1.6-5.2)	0.1263	5.5 (5.2-6.1)	4.0 (1.6-5.2)	0.0374	5.0 (3.1-5.5)	3.9 (1.6-5.2)	0.0382

n = number. IQR = interquartile range.

2.4. Correlations of Cycle Threshold (Ct) Values with HIV Viral Load and CD4+ Cell Count

During the correlation of the cycle threshold (Ct) values and HIV viral load, as well as the CD4+ T cell count, a significant positive correlation could be shown for the HIV viral load and the Ct values of the *S. haematobium* complex only. The details are provided in Table 3.

Table 3. Correlations (Spearman's rho) of cycle threshold (Ct) values of the real-time PCRs targeting the *S. mansoni* complex and *S. haematobium* complex with the HIV (human immunodeficiency virus) viral load and CD4+ (CD = cluster of differentiation) cell count.

	CD4+ T Cell Count <i>n</i>, rho, p Value	Viral Load <i>n</i>, rho, p Value
<i>S. mansoni</i> complex specific real-time PCR	35, 0.1521, 0.3830	34, -0.4697, 0.0051
<i>S. haematobium</i> complex specific real-time PCR	5, -0.8, 0.1041	3, 1.0000, <0.001

n = total number. rho = Spearman's rho indicating correlation.

3. Discussion

The study was performed to search for associations between systemic *Schistosoma* spp. infections and *Leishmania* spp. infections and the HIV status in a Ghanaian study population with a high proportion of HIV infections. As expected for Ghana, the majority of individuals were free of active schistosomiasis, as indicated by the serum PCR, and no hints of the DNA of systemically circulating leishmaniae were found. As similarly seen

in a previous study [47], a low portion of schistosomiasis within the one-digit percent range was observed, and only a weak association of HIV positivity and active *S. mansoni* complex infections could be demonstrated, which disappeared as soon as the results of the *S. haematobium* complex screening were added. Consequently, the HIV status is—if any—only a weak predictor of *Schistosoma* spp. infections in Ghana, even weaker than the observed association with the male sex and younger age. This is well in line with the previous results from Angola, Kenya, and Zambia [56] and quite plausible, as there is no obvious reason why the mode of infection in the case of schistosomiasis should be influenced by the immunological status of the individuals at risk, although one might speculate that poor socio-economic conditions might predispose them for higher risks of acquiring HIV and schistosomiasis.

Focusing on HIV-specific infection- and immune parameters, tendencies of a higher viral load, lower CD4+ T cell count, and lower CD4+/CD8+ ratio with schistosomiasis were observed. However, the significance is low and not consistent for both *Schistosoma* species complexes. The observed positive correlation between the cycle threshold values of the *S. haematobium* complex PCR and the HIV viral load, suggesting associations between low parasitemia and high viremia, makes the interpretation of those results difficult as well. The study is in line with the previous results suggesting higher CD8+ cell counts in HIV patients co-infected with helminths [61,62], as indicated by the recorded lower CD4+/CD8+ ratio. The observed lower CD4+ T cell count, however, is in contrast to the previous studies indicating either comparable [62,63] or even higher CD4+ cell counts [64] in HIV patients co-infected with schistosomes. Also, the findings of the present study are in contrast with a previous study which did not find any hints for higher HIV virus loads in patients with helminth infections [65], however, without a specific focus on schistosomes alone. Considering the partly weak significance levels, as observed in the here-described exploratory assessment, the relevance of these findings is, however, questionable, and confirmation by sufficiently powered confirmatory assessments is required.

Altogether, the observed Ct values were not in an unexpected range. In a recent screening with a Madagascan population, in which the HIV rate was extremely low [66], quite similar Ct values for the *S. mansoni* complex were observed by applying the same real-time PCR assay [51]. Although other factors, such as the worm load in the patients' blood, also affect the measures of the Ct values, it seems justified that a relevant effect of HIV positivity on the measured Ct values is not very likely. This finding is in contrast with a previous assessment which suggested higher *Schistosoma* spp. infection intensities in HIV-positive individuals in Tanzania [52]. A possible explanation for the discrepancy might comprise socio-economic differences in Ghanaian and Tanzanian HIV patients, potentially resulting in a stronger poverty-related need for risk exposure to schistosome-contaminated surface water by Tanzanian HIV patients. However, the available data are insufficient to verify or falsify this hypothesis.

The study has a number of limitations. Due to the known uneven geographical distribution of schistosomiasis in Ghana [14–29], the resulting low overall prevalence made any conclusions on significant associations challenging. However, big differences would most likely not have gone undetected. Second, the medical history of deworming therapy of the study population was not available. The frequency of previous therapeutic interventions might be a difficult-to-control source of bias because PCR becomes negative if active infection is therapeutically cured, leading to a lower prevalence estimation of previous infections. To estimate the relevance of this bias, a parallel serological assessment of the samples, as performed in a previous study [51], would have been an option because serology also indicates previous, already successfully cured infections. This was, however, unfeasible due to the financial restrictions of this investigator-initiated study. Third, the uneven proportion of HIV-positive and HIV-negative study participants was a random effect resulting from the composition of the previous studies from which the assessed residual sample materials were taken for this retrospective assessment [52,53]. Accordingly, no case number estimations for the proof of the assumed effects could be performed, and the study has to be considered hypothesis-forming. Fourth, parasitic infections, such as schistosomiasis, are affected by external influences, such as seasonality, as stated above, which has not been specifically addressed in this study.

However, (a) the study did not discriminate between acute and chronic infections, and (b) all of the compared groups were exposed to similar exposition conditions, which limits the relevance of such influences. Fifth, the samples' age of 10 years at the time of the assessment may have resulted in DNA degradation and—associated with this—in an underestimation of the prevalence of the assessed parasitic infections. However, as optimal storage conditions were ensured by the deep-freezing of the samples at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, the quantitative dimension of this problem was considered to be low. Sixth, due to the hypothesis-forming, exploratory approach of the study and the restricted number of available datasets, the bio-statistic assessments were restricted to simple statistic approaches. In line with this, a standardized significance threshold of a $p \leq 0.05$ was accepted for each hypothesis, thus accepting that many significances were weak and would have lost presence if correcting for multiple testing, e.g., by applying the Bonferroni–Holm method, would have been applied. Larger-sized and, thus, sufficiently powered confirmatory studies will be necessary to confirm or exclude the observed hypotheses. The data as described in this study may serve for inclusion in sample size calculations depending on the chosen endpoint of such confirmatory assessments.

4. Materials and Methods

4.1. Patients and Patient Samples

The study was performed with a group of 1095 HIV-positive Ghanaian patients and a smaller comparison group of 107 HIV-negative Ghanaian blood donors. Residual serum samples that had been taken in the course of the previous studies, as detailed elsewhere [67–71], were available for 1083 individuals (980 HIV positive and 103 HIV negative). Clinical information comprised age, sex, HIV status, and the HIV patients' immunological situation as expressed by the CD4+ lymphocyte count, the CD4+/CD8+ ratio, and the HIV viral load of the HIV-positive patients from the previous assessments [67,68]. Serum samples had been stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ prior to the analyses.

4.2. Diagnostic Procedures

Nucleic acid extraction was performed by applying the EZ1 Virus Mini Kit v2.0 Kit (Qiagen, Hilden, Germany) on an automated EZ1 Advanced system (Qiagen, Hilden, Germany), an approach that had already allowed the successful detection of *Leishmania* spp. kDNA in serum samples of patients with visceral leishmaniasis [49]. The extractions were performed directly prior to the PCR assessments after 10 years of deep-frozen storage of the serum samples at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Afterward, the eluates were assessed by *Leishmania* spp.-specific kDNA real-time PCR [49] and by a triplex real-time PCR targeting the *S. mansoni* complex-specific *Sm1-7* sequence, the *S. haematobium* complex-specific *Dra1* sequence [50], and a Phocid herpes virus (PhHV) sequence that was added as a plasmid to the samples prior to nucleic acid extraction, thus allowing combined extraction and inhibition control assessment as described before [72]. Both PCR assays were run on RotorGene Q cyclers (Qiagen, Hilden, Germany) or magnetic induction cyclers (MIC, Bio Molecular Systems Ltd., London, UK) exactly as detailed before with open access published protocols [49,50]. Each run was accompanied by a plasmid-based positive control and a PCR-grade water-based negative control, also as described in [49,50]. By applying diagnostic conditions identical to the laboratory's diagnostic routine, standardized quality was ensured.

4.3. Statistical Assessment

First, the recorded prevalence of *Leishmania* spp., the *S. mansoni* complex, and the *S. haematobium* complex was assessed for the population and associated with age, sex, HIV status, and immunological status in a descriptive assessment. Second, a diagnostic accuracy-adjusted prevalence estimation was conducted, as described elsewhere [60,73]. Third, a correlation between the immunologically relevant parameters, i.e., the CD4+ lymphocyte count and HIV virus load, on the one hand and the recorded pathogen-specific cycle threshold (Ct) values on the other hand was attempted. The calculations were conducted using the software Stata/IC 15.1 for Mac 64-bit Intel (College Station, TX, USA).

5. Conclusions

In spite of the above-mentioned limitations, the assessment provided the first insights into potential associations between schistosomiasis and HIV status in Ghana. The results suggest only weak associations, making the influence of factors other than the HIV status on schistosomiasis highly likely. Weakly significant signs of potential associations between schistosomiasis and unfavorable factors, such as a high viral load and reduced CD4+ T cell count, have to be considered as hypothesis-forming only and should be re-assessed by sufficiently powered prospective studies. This is particularly the case because a recent review only partially confirmed the results of the assessment [57], while, however, the overall evidence is still low.

Author Contributions: Conceptualization, H.F., A.H. and K.A.E.; methodology, F.W. (Franziska Weinreich), F.W. (Felix Weinreich), A.H. and H.F.; software, F.W. (Franziska Weinreich), F.W. (Felix Weinreich) and A.H.; validation, F.W. (Franziska Weinreich) and F.W. (Felix Weinreich); formal analysis, A.H.; investigation, F.W. (Franziska Weinreich), F.W. (Felix Weinreich), A.D., S.O.A., R.B. and A.H.; resources, H.F., K.A.E., T.F. and F.S.S.; data curation, F.W. (Franziska Weinreich), F.W. (Felix Weinreich) and A.H.; writing—original draft preparation, F.W. (Franziska Weinreich) and H.F.; writing—review and editing, F.W. (Franziska Weinreich), F.W. (Felix Weinreich), A.H., R.M.H., K.A.E., H.R., T.F., F.S.S., A.D., S.O.A., R.B. and H.F.; supervision, H.F., H.R. and R.M.H.; project administration, H.F.; funding acquisition, H.F. and K.A.E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Parts of the study (the nucleic acid extraction and real-time PCR reactions) were funded by grant 36K2-S-45 1922, “Evaluation and optimization of molecular diagnostic tests for tropical parasitic diseases for surveillance and risk assessment purposes in tropical deployment settings—a German–French cooperation project between the German Armed Forces Hospital Hamburg and the Military Hospital Laveran, Marseille” of the German Ministry of Defense (MoD) awarded to Hagen Frickmann. The implementation of the study was supported by the ESTHER Alliance for Global Health Partnerships and the German Federal Ministry of Education and Research (Project No. 01KA1102). We acknowledge support from the Open Access Publication Funds of the Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine Hamburg.

Institutional Review Board Statement: Samples were collected and analyzed under protocols approved by the Committee on Human Research of the Kwame Nkrumah University of Science and Technology in Kumasi, Ghana: CHRPE/AP/12/11 (approved on 8 September 2012), and the ethics committee of the Medical Council in Hamburg, Germany: PV3771. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Informed Consent Statement: All participants gave written informed consent prior to enrolment.

Data Availability Statement: All relevant details are provided in the manuscript. Raw data can be made available at reasonable request.

Acknowledgments: We are thankful to the nurses and physicians of the HIV clinic and the blood bank of the Komfo Anokye Teaching Hospital in Kumasi, Ghana for their support. Annett Michel and Simone Priesnitz are gratefully acknowledged for excellent technical assistance.

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

References

- Akuffo, R.; Wilson, M.; Sarfo, B.; Attram, N.; Mosore, M.T.; Yeboah, C.; Cruz, I.; Ruiz-Postigo, J.A.; Boakye, D.; Moreno, J.; et al. Prevalence of Leishmania infection in three communities of Oti Region, Ghana. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2021**, *15*, e0009413. [\[CrossRef\]](#)
- Akuffo, R.; Sanchez, C.; Chicharro, C.; Carrillo, E.; Attram, N.; Mosore, M.T.; Yeboah, C.; Kotey, N.K.; Boakye, D.; Ruiz-Postigo, J.A.; et al. Detection of cutaneous leishmaniasis in three communities of Oti Region, Ghana. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2021**, *15*, e0009416. [\[CrossRef\]](#)
- Kweku, M.A.; Odoom, S.; Puplampu, N.; Desewu, K.; Nuako, G.K.; Gyan, B.; Racznik, G.; Kronmann, K.C.; Koram, K.; Botero, S.; et al. An outbreak of suspected cutaneous leishmaniasis in Ghana: Lessons learnt and preparation for future outbreaks. *Glob. Health Action* **2011**, *4*. [Epub ahead of print]. [\[CrossRef\]](#)
- Villinski, J.T.; Klena, J.D.; Abbassy, M.; Hoel, D.F.; Puplampu, N.; Mechta, S.; Boakye, D.; Racznik, G. Evidence for a new species of Leishmania associated with a focal disease outbreak in Ghana. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2008**, *60*, 323–327. [\[CrossRef\]](#)
- Fryauff, D.J.; Hanafi, H.A.; Klena, J.D.; Hoel, D.F.; Appawu, M.; Rogers, W.; Puplampu, N.; Odoom, S.; Kweku, M.; Koram, K.; et al. Short report: ITS-1 DNA sequence confirmation of Leishmania major as a cause of cutaneous leishmaniasis from an outbreak focus in the Ho district, southeastern Ghana. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *75*, 502–504. [\[CrossRef\]](#)
- Akuffo, R.; Wilson, M.; Sarfo, B.; Dako-Gyeke, P.; Adanu, R.; Anto, F. Insecticide-treated net (ITN) use, factors associated with non-use of ITNs, and occurrence of sand flies in three communities with reported cases of cutaneous leishmaniasis in Ghana. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0261192. [\[CrossRef\]](#)
- Cissé, M.; Zida, A.; Diallo, A.H.; Marty, P.; Aoun, K. Épidémiologie de la leishmaniose cutanée en Afrique de l'Ouest: Revue systématique. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **2020**, *113*, 24–34. [\[CrossRef\]](#)
- Boakye, D.A.; Wilson, M.; Kweku, M. A review of leishmaniasis in west Africa. *Ghana Med. J.* **2005**, *39*, 94–97.
- Kwakyere-Nuako, G.; Mosore, M.T.; Duplessis, C.; Bates, M.D.; Puplampu, N.; Mensah-Attipoe, I.; Desewu, K.; Afegbe, G.; Asmah, R.H.; Jamjoom, M.B.; et al. First isolation of a new species of Leishmania responsible for human cutaneous leishmaniasis in Ghana and classification in the *Leishmania enriettii* complex. *Int. J. Parasitol.* **2015**, *45*, 679–684. [\[CrossRef\]](#)
- Nzulu, C.O.; Kato, H.; Puplampu, N.; Desewu, K.; Odoom, S.; Wilson, M.D.; Sakurai, T.; Katakura, K.; Boakye, D.A. First detection of *Leishmania tropica* DNA and *Trypanosoma* species in *Sergentomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) from an outbreak area of cutaneous leishmaniasis in Ghana. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e2630. [\[CrossRef\]](#)
- Sadlova, J.; Vojtkova, B.; Becvar, T.; Lestinova, T.; Spitzova, T.; Bates, P.; Volf, P. Host competence of the African rodents *Arvicanthis neumanni*, *A. niloticus* and *Mastomys natalensis* for *Leishmania donovani* from Ethiopia and *Mundinia* sp. from Ghana. *Int. J. Parasitol. Parasites. Wildl.* **2019**, *11*, 40–45. [\[CrossRef\]](#)
- Mira, J.A.; Corzo, J.E.; Rivero, A.; Macias, J.; De Leon, F.L.; Torre-Cisneros, J.; Gomez-Mateos, J.; Jurado, R.; Pineda, J.A. Frequency of visceral leishmaniasis relapses in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2004**, *70*, 298–301. [\[CrossRef\]](#)
- Cota, G.F.; de Sousa, M.R.; Rabello, A. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV-infected patients: A systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1153. [\[CrossRef\]](#)
- Lyons, G.R. Schistosomiasis in north-western Ghana. *Bull. World Health Organ* **1974**, *51*, 621–632.
- Szela, E.; Bachicha, J.; Miller, D.; Till, M.; Wilson, J.B. Schistosomiasis and cervical cancer in Ghana. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **1993**, *42*, 127–130. [\[CrossRef\]](#)
- Ntajal, J.; Evers, M.; Kistemann, T.; Falkenberg, T. Influence of human-surface water interactions on the transmission of urinary schistosomiasis in the Lower Densu River basin, Ghana. *Soc. Sci. Med.* **2021**, *288*, 113546. [\[CrossRef\]](#)
- Yirenya-Tawiah, D.; Amoah, C.; Apea-Kubi, K.A.; Dade, M.; Ackumey, M.; Annang, T.; Mensah, D.Y.; Bosompem, K.M. A survey of female genital schistosomiasis of the lower reproductive tract in the volta basin of Ghana. *Ghana Med. J.* **2011**, *45*, 16–21. [\[CrossRef\]](#)
- Aryeetey, M.E.; Wagatsuma, Y.; Yeboah, G.; Asante, M.; Mensah, G.; Nkrumah, F.K.; Kojima, S. Urinary schistosomiasis in southern Ghana: 1. Prevalence and morbidity assessment in three (defined) rural areas drained by the Densu river. *Parasitol. Int.* **2000**, *49*, 155–163. [\[CrossRef\]](#)
- Scott, D.; Senker, K.; England, E.C. Epidemiology of human *Schistosoma haematobium* infection around Volta Lake, Ghana, 1973–1975. *Bull. World Health Organ.* **1982**, *60*, 89–100.
- Bozdech, V. Incidence of schistosomiasis in the urban population of Accra, Ghana. *Folia Parasitol.* **1972**, *19*, 171–174.
- Wolfe, M.S. Urinary schistosomiasis in Ghana: A report of 53 cases, with special reference to pyelographic and cystoscopic abnormalities. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1967**, *61*, 90–99. [\[CrossRef\]](#)
- Wagatsuma, Y.; Aryeetey, M.E.; Nkrumah, F.K.; Sack, D.A.; Kojima, S. Highly symptom-aware children were heavily infected with urinary schistosomiasis in southern Ghana. *Cent. Afr. J. Med.* **2003**, *49*, 16–19.
- McCullough, F.S. The distribution of human schistosomiasis and the potential snail hosts in Ghana. *West. Afr. Med. J.* **1957**, *6*, 87–97.
- Bogoch, I.I.; Koydemir, H.C.; Tseng, D.; Ephraim, R.K.D.; Duah, E.; Tee, J.; Andrews, J.R.; Ozcan, A. Evaluation of a Mobile Phone-Based Microscope for Screening of *Schistosoma haematobium* Infection in Rural Ghana. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2017**, *96*, 1468–1471. [\[CrossRef\]](#)

25. Klumpp, R.K.; Chu, K.Y. Importance of the aquatic weed *Ceratophyllum* to transmission of *Schistosoma haematobium* in the Volta Lake, Ghana. *Bull. World Health Organ.* **1980**, *58*, 791–798.
26. Rosei, L.; McCullough, F.S.; Odei, M.A. Bilharziasis in the Brong Ahafo Region of Ghana. *West. Afr. Med. J.* **1966**, *15*, 75–79.
27. Amankwa, J.A.; Bloch, P.; Meyer-Lassen, J.; Olsen, A.; Christensen, N.O. Urinary and intestinal schistosomiasis in the Tono Irrigation Scheme, Kassena/Nankana District, upper east region, Ghana. *Trop. Med. Parasitol.* **1994**, *45*, 319–323.
28. Wen, S.T.; Chu, K.Y. Preliminary schistosomiasis survey in the lower Volta River below Akosombo Dam, Ghana. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1984**, *78*, 129–133. [[CrossRef](#)]
29. Anyan, W.K.; Abonie, S.D.; Aboagye-Antwi, F.; Tettey, M.D.; Nartey, L.K.; Hanington, P.C.; Anang, A.K.; Muench, S.B. Concurrent *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infections in a peri-urban community along the Weija dam in Ghana: A wake up call for effective National Control Programme. *Acta Trop.* **2019**, *199*, 105116. [[CrossRef](#)]
30. Ekpo, U.F.; Oluwole, A.S.; Abe, E.M.; Etta, H.E.; Olamiju, F.; Mafiana, C.F. Schistosomiasis in infants and pre-school-aged children in sub-Saharan Africa: Implication for control. *Parasitology* **2012**, *139*, 835–841. [[CrossRef](#)]
31. Bosompem, K.M.; Bentum, I.A.; Otchere, J.; Anyan, W.K.; Brown, C.A.; Osada, Y.; Takeo, S.; Kojima, S.; Ohta, N. Infant schistosomiasis in Ghana: A survey in an irrigation community. *Trop. Med. Int. Health.* **2004**, *9*, 917–922. [[CrossRef](#)]
32. Kabore, A.; Biritwum, N.K.; Downs, P.W.; Soares Magalhaes, R.J.; Zhang, Y.; Ottesen, E.A. Predictive vs. empiric assessment of schistosomiasis: Implications for treatment projections in Ghana. *PLoS Negl Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2051. [[CrossRef](#)]
33. Duah, E.; Kenu, E.; Adela, E.M.; Halm, H.A.; Agoni, C.; Kumi, R.O. Assessment of urogenital schistosomiasis among basic school children in selected communities along major rivers in the central region of Ghana. *Pan Afr. Med. J.* **2021**, *40*, 96.
34. Chan, M.S.; Nsoah-Nuamah, N.N.; Adjei, S.; Wen, S.T.; Hall, A.; Bundy, D.A. Predicting the impact of school-based treatment for urinary schistosomiasis given by the Ghana Partnership for Child Development. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1998**, *92*, 386–389. [[CrossRef](#)]
35. Kosinski, K.C.; Kulinkina, A.V.; Tybor, D.; Osabutey, D.; Bosompem, K.M.; Naumova, E.N. Agreement among Four Prevalence Metrics for Urogenital Schistosomiasis in the Eastern Region of Ghana. *Biomed. Res. Int.* **2016**, *2016*, 7627358. [[CrossRef](#)]
36. Orish, V.N.; Ofori-Amoah, J.; Amegan-Aho, K.H.; Osisiogu, E.U.; Osei-Yeboah, J.; Lokpo, S.Y.; Allotey, E.A.; Adu-Amankwah, J.; Azuma, D.E.; Agordoh, P.D. Eosinophilia in school-going children with *Plasmodium falciparum* and helminth infections in the Volta Region of Ghana. *Pan Afr. Med. J.* **2021**, *38*, 277. [[CrossRef](#)]
37. Wrable, M.; Kulinkina, A.V.; Liss, A.; Koch, M.; Cruz, M.S.; Biritwum, N.K.; Ofosu, A.; Gute, D.M.; Kosinski, K.C.; Naumova, E.N. The use of remotely sensed environmental parameters for spatial and temporal schistosomiasis prediction across climate zones in Ghana. *Environ. Monit. Assess.* **2019**, *191*, 301. [[CrossRef](#)]
38. Kulinkina, A.V.; Kosinski, K.C.; Plummer, J.D.; Durant, J.L.; Bosompem, K.M.; Adjei, M.N.; Griffiths, J.K.; Gute, D.M.; Naumova, E.N. Indicators of improved water access in the context of schistosomiasis transmission in rural Eastern Region, Ghana. *Sci. Total Environ.* **2017**, *579*, 1745–1755. [[CrossRef](#)]
39. Aryeetey, M.E.; Aholu, C.; Wagatsuma, Y.; Bentil, G.; Nkrumah, F.K.; Kojima, S. Health education and community participation in the control of urinary schistosomiasis in Ghana. *East Afr. Med. J.* **1999**, *76*, 324–329.
40. Tanser, F.; Azongo, D.K.; Vandormael, A.; Bärnighausen, T.; Appleton, C. Impact of the scale-up of piped water on urogenital schistosomiasis infection in rural South Africa. *Elife* **2018**, *7*, e33065. [[CrossRef](#)]
41. Kulinkina, A.V.; Walz, Y.; Koch, M.; Biritwum, N.K.; Utzinger, J.; Naumova, E.N. Improving spatial prediction of *Schistosoma haematobium* prevalence in southern Ghana through new remote sensors and local water access profiles. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, e0006517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Kosinski, K.C.; Adjei, M.N.; Bosompem, K.M.; Crocker, J.J.; Durant, J.L.; Osabutey, D.; Plummer, J.D.; Stadercker, M.J.; Wagner, A.D.; Woodin, M.; et al. Effective control of *Schistosoma haematobium* infection in a Ghanaian community following installation of a water recreation area. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kosinski, K.C.; Kulinkina, A.V.; Abrah, A.F.; Adjei, M.N.; Breen, K.M.; Chaudhry, H.M.; Nevin, P.E.; Warner, S.H.; Tendulkar, S.A. A mixed-methods approach to understanding water use and water infrastructure in a schistosomiasis-endemic community: Case study of Asamama, Ghana. *BMC Public Health* **2016**, *16*, 322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Nsoah-Nuamah, N.N.; Mensah, G.; Aryeetey, M.E.; Wagatsuma, Y.; Bentil, G. Urinary schistosomiasis in southern Ghana: A logistic regression approach to data from a community-based integrated control program. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2001**, *65*, 484–490. [[CrossRef](#)]
45. Hunter, J.M. Inherited burden of disease: Agricultural dams and the persistence of bloody urine (*Schistosomiasis haematobium*) in the Upper East Region of Ghana, 1959–1997. *Soc. Sci. Med.* **2003**, *56*, 219–234. [[CrossRef](#)]
46. Deschiens, R. L'incidence de la création des lacs de retenue des grands barrages africains sur les endémies parasitaires. Etude comparée du lac d'Akosombo sur la Volta Noire (Ghana) et du lac Nasser sur le Nil (Egypte, Soudan). *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* **1972**, *65*, 240–263.
47. Boaitay, Y.A.; Nkrumah, B.; Idriss, A.; Tay, S.C. Gastrointestinal and urinary tract pathogenic infections among HIV seropositive patients at the Komfo Anokye Teaching Hospital in Ghana. *BMC Res. Notes* **2012**, *5*, 454. [[CrossRef](#)]
48. Yirenya-Tawiah, D.; Annang, T.N.; Apea-Kubi, K.A.; Lomo, G.; Mensah, D.; Akyeh, L.; Bosompem, K.M. *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* prevalence among women of reproductive age living in urogenital schistosomiasis endemic area in Ghana. *BMC Res. Notes* **2014**, *7*, 349. [[CrossRef](#)]

49. Tanida, K.; Balczun, C.; Hahn, A.; Veit, A.; Nickel, B.; Poppert, S.; Scheid, P.L.; Hagen, R.M.; Frickmann, H.; Loderstädt, U.; et al. Comparison of Three In-House Real PCR Assays Targeting Kinetoplast DNA, the Small Subunit Ribosomal RNA Gene and the Glucose-6-Phosphate Isomerase Gene for the Detection of *Leishmania* spp. in Human Serum. *Pathogens* **2021**, *10*, 826. [CrossRef]
50. Frickmann, H.; Lunardon, L.M.; Hahn, A.; Loderstädt, U.; Lindner, A.K.; Becker, S.L.; Mockenhaupt, F.P.; Weber, C.; Tannich, E. Evaluation of a duplex real-time PCR in human serum for simultaneous detection and differentiation of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infections—cross-sectional study. *Travel Med. Infect. Dis.* **2021**, *41*, 102035. [CrossRef]
51. Hoffmann, T.; Carsjens, I.; Rakotozandrindrainy, R.; Girmann, M.; Randriamampionona, N.; Maïga-Ascofaré, O.; Podbielski, A.; Hahn, A.; Frickmann, H.; Schwarz, N.G. Serology- and Blood-PCR-Based Screening for Schistosomiasis in Pregnant Women in Madagascar—A Cross-Sectional Study and Test Comparison Approach. *Pathogens* **2021**, *10*, 722. [CrossRef] [PubMed]
52. Downs, J.A.; van Dam, G.J.; Changalucha, J.M.; Corstjens, P.L.; Peck, R.N.; de Dood, C.J.; Bang, H.; Andreasen, A.; Kalluvya, S.E.; van Lieshout, L.; et al. Association of Schistosomiasis and HIV infection in Tanzania. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2012**, *87*, 868–873. [CrossRef] [PubMed]
53. Downs, J.A.; Dupnik, K.M.; van Dam, G.J.; Urassa, M.; Lutonja, P.; Kornelis, D.; de Dood, C.J.; Hoekstra, P.; Kanjala, C.; Isingo, R.; et al. Effects of schistosomiasis on susceptibility to HIV-1 infection and HIV-1 viral load at HIV-1 seroconversion: A nested case-control study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005968. [CrossRef] [PubMed]
54. Ssetaala, A.; Nakiyingi-Miro, J.; Asiki, G.; Kyakuwa, N.; Mpendo, J.; Van Dam, G.J.; Corstjens, P.L.; Pala, P.; Nielsen, L.; Bont, J.; et al. *Schistosoma mansoni* and HIV acquisition in fishing communities of Lake Victoria, Uganda: A nested case-control study. *Trop. Med. Int. Health* **2015**, *20*, 1190–1195. [CrossRef]
55. Ndhlovu, P.D.; Mduluzza, T.; Kjetland, E.F.; Midzi, N.; Nyanga, L.; Gundersen, S.G.; Friis, H.; Gomo, E. Prevalence of urinary schistosomiasis and HIV in females living in a rural community of Zimbabwe: Does age matter? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *101*, 433–488. [CrossRef]
56. Ndeffo Mbah, M.L.; Gilbert, J.A.; Galvani, A.P. Evaluating the potential impact of mass praziquantel administration for HIV prevention in *Schistosoma haematobium* high-risk communities. *Epidemics* **2014**, *7*, 22–27. [CrossRef]
57. Furch, B.D.; Koethe, J.R.; Kayamba, V.; Heimbürger, D.C.; Kelly, P. Interactions of *Schistosoma* and HIV in Sub-Saharan Africa: A Systematic Review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2020**, *102*, 711–718. [CrossRef]
58. Rogan, W.J.; Gladen, B. Estimating prevalence from the results of a screening test. *Am. J. Epidemiol.* **1978**, *107*, 71–76. [CrossRef]
59. Gart, J.J.; Buck, A.A. Comparison of a screening test and a reference test in epidemiologic studies. II. A probabilistic model for the comparison of diagnostic tests. *Am. J. Epidemiol.* **1966**, *83*, 593–602. [CrossRef]
60. Hahn, A.; Schwarz, N.G.; Frickmann, H. Comparison of screening tests without a gold standard—A pragmatic approach with virtual reference testing. *Acta Trop.* **2019**, *199*, 105118. [CrossRef]
61. Mulu, A.; Maier, M.; Liebert, U.G. Deworming of intestinal helminths reduces HIV-1 subtype C viremia in chronically co-infected individuals. *Int. J. Infect. Dis.* **2013**, *17*, e897–e901. [CrossRef] [PubMed]
62. Obuku, A.E.; Asiki, G.; Abaasa, A.; Ssonko, I.; Harari, A.; van Dam, G.J.; Corstjens, P.L.; Joloba, M.; Ding, S.; Mpendo, J.; et al. Effect of *Schistosoma mansoni* Infection on Innate and HIV-1-Specific T-Cell Immune Responses in HIV-1-Infected Ugandan Fisher Folk. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **2016**, *32*, 668–675. [CrossRef] [PubMed]
63. Mwinzi, P.N.; Karanja, D.M.; Kareko, I.; Magak, P.W.; Orago, A.S.; Colley, D.G.; Secor, W.E. Short report: Evaluation of hepatic fibrosis in persons co-infected with *Schistosoma mansoni* and human immunodeficiency virus 1. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2004**, *71*, 783–786. [CrossRef] [PubMed]
64. Colombe, S.; Machelamba, R.; Mtenga, B.; Lutonja, P.; Kalluvya, S.E.; de Dood, C.J.; Hoekstra, P.T.; van Dam, G.J.; Corstjens, P.L.A.M.; Urassa, M.; et al. Impact of schistosome infection on long-term HIV/AIDS outcomes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, e0006613. [CrossRef] [PubMed]
65. Brown, M.; Kizza, M.; Watera, C.; Quigley, M.A.; Rowland, S.; Hughes, P.; Whitworth, J.A.; Elliott, A.M. Helminth infection is not associated with faster progression of HIV disease in coinfected adults in Uganda. *J. Infect. Dis.* **2004**, *190*, 1869–1879. [CrossRef] [PubMed]
66. Frickmann, H.; Schwarz, N.G.; Girmann, M.; Hagen, R.M.; Poppert, S.; Crusius, S.; Podbielski, A.; Heriniaina, J.N.; Razafindrabe, T.; Rakotondrainarivelo, J.P.; et al. Serological survey of HIV and syphilis in pregnant women in Madagascar. *Trop. Med. Int. Health* **2013**, *18*, 35–39. [CrossRef] [PubMed]
67. Eberhardt, K.A.; Sarfo, F.S.; Dompheh, A.; Kuffour, E.O.; Geldmacher, C.; Soltau, M.; Schachscheider, M.; Drexler, J.F.; Eis-Hübinger, A.M.; Häussinger, D.; et al. *Helicobacter pylori* Coinfection Is Associated with Decreased Markers of Immune Activation in ART-Naïve HIV-Positive and in HIV-Negative Individuals in Ghana. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *61*, 1615–1623. [CrossRef]
68. Sarfo, F.S.; Eberhardt, K.A.; Dompheh, A.; Kuffour, E.O.; Soltau, M.; Schachscheider, M.; Drexler, J.F.; Eis-Hübinger, A.M.; Häussinger, D.; Oteng-Seifah, E.E.; et al. *Helicobacter pylori* Infection Is Associated with Higher CD4 T Cell Counts and Lower HIV-1 Viral Loads in ART-Naïve HIV-Positive Patients in Ghana. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0143388. [CrossRef]
69. Di Cristanziano, V.; D'Alfonso, R.; Berrilli, F.; Sarfo, F.S.; Santoro, M.; Fabeni, L.; Knops, E.; Heger, E.; Kaiser, R.; Dompheh, A.; et al. Lower prevalence of *Blastocystis* sp. infections in HIV positive compared to HIV negative adults in Ghana. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0221968.

70. Di Cristanziano, V.; Weimer, K.; Böttcher, S.; Sarfo, F.S.; Dompok, A.; Cesar, L.G.; Knops, E.; Heger, E.; Wirtz, M.; Kaiser, R.; et al. Molecular Characterization and Clinical Description of Non-Polio Enteroviruses Detected in Stool Samples from HIV-Positive and HIV-Negative Adults in Ghana. *Viruses* **2020**, *12*, 221. [[CrossRef](#)]
71. Eberhardt, K.A.; Sarfo, F.S.; Klupp, E.M.; Dompok, A.; Di Cristanziano, V.; Osei Kuffour, E.; Boateng, R.; Norman, B.; Phillips, R.O.; Aepfelbacher, M.; et al. Intestinal Colonization with *Tropheryma whippelii*-Clinical and Immunological Implications for HIV Positive Adults in Ghana. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Niesters, H.G. Quantitation of Viral Load Using Real-Time Amplification Techniques. *Methods* **2001**, *25*, 419–429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Hahn, A.; Podbielski, A.; Meyer, T.; Zautner, A.E.; Loderstädt, U.; Schwarz, N.G.; Krüger, A.; Cadar, D.; Frickmann, H. On detection thresholds-a review on diagnostic approaches in the infectious disease laboratory and the interpretation of their results. *Acta Trop.* **2020**, *205*, 105377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Zusammenfassende Darstellung der Publikation

2.1. Einleitung

Opportunistische Erkrankungen gehören zu den häufigsten Komplikationen einer HIV-Infektion: ca. 30-50% der Personen mit einer neu diagnostizierten und damit unbehandelten HIV-Infektion haben AIDS-definierende Erkrankungen [Brooks et al., 2009]. Somit sind die durch eine HIV-Infektion meist immunkompromitierten Infizierten von den in der Umwelt anzutreffenden Parasiten gefährdet. Hinzu kommen die Umwelt- und sozioökonomischen Faktoren, die einen Erkrankungsfall bei Infektion negativ beeinflussen können. Armut, Mangelernährung, schlechte hygienische Bedingungen und feuchtwarmes Klima spielen eine entscheidende Rolle zur Begünstigung der Verbreitung dieser Infektionen [WHO, Fact Sheet Leishmaniasis].

Dass sozioökonomische Faktoren in enger Wechselwirkung zu einer HIV-Infektion bzw. einer AIDS-Erkrankung stehen, wurde bereits hinreichend dargestellt. Beispielsweise kann der Faktor „Armut“ den allgemeinen Krankheitsverlauf stark beeinflussen. Hierbei zählt nicht nur ein geringes Vermögen, sondern auch politische, soziokulturelle, wirtschaftliche Faktoren und die Chancenungleichheit [Wilmink, 2008]. So führen eingeschränkte finanzielle Mittel zu einem schlechteren Zugang zu medizinischer Versorgung, geringerem Bildungsstand aufgrund zusätzlicher Kosten, begrenzten Maßnahmen, das häusliche Umfeld in einem angemessenen hygienischen Zustand zu halten, Prävention bezüglich der Übertragungswege einer Infektion adäquat umzusetzen, usw. [Wilmink, 2008]. Armut ist nicht nur Ursache, sondern kann auch Folge einer HIV-Infektion sein bzw. eine aktuell missliche Lage deutlich verschärfen [Schulz & Köbrich, 2002]. „Armut bedeutet nicht nur niedriges Einkommen oder Mangel an materiellen Gütern. Es heißt auch, wenig Einfluss auf die Bedingungen ausüben zu können, unter denen man seine Existenz bestreiten und sein Leben aufbauen muss“ [Rüppel, 2001].

In der hier vorgestellten Studie wurde im westafrikanischen Ghana, in welchem Armut weiterhin für einen relevanten Anteil der Bevölkerung alltäglich ist, bei einer Stichprobe von HIV-Infizierten zusätzliche parasitäre Erkrankungen und deren Wechselwirkungen genauer untersucht. Hierfür wurden in der HIV-Ambulanz im Komfo Anokye Teaching Hospital in Kumasi, Ghana, im Zeitraum von November 2011 bis November 2012 als Querschnittsbeobachtung Blutproben von HIV-positiven Patienten und von einer kleinen Kontrollgruppe von Ghanaern ohne HIV entnommen [Eberhardt et al., 2015].

All diese Serumproben wurden mittels eines Echtzeit-PCR-basierten Screenings auf Spezies von Leishmanien [Tanida et al., 2021] und Schistosomen [Frickmann et al., 2021, Hoffmann et al., 2021] untersucht. In Anbetracht der Tatsache, dass aus Ghana nur die kutane Leishmaniose bekannt ist [Akuffo et al., 2021, Kweku et al., 2011, Villinski et al., 2008, Fryauff et al., 2006, Cissé et al., 2020, Boakye et al., 2005, Kwakye-Nuako et al., 2015, Nzelu et al., 2014, Sadlova et al., 2019] und der angewandte Leishmanien-spezifische kDNA-PCR-Assay

[Tanida et al., 2021] nur für im Blut zirkulierende DNA bei viszeraler Leishmaniose evaluiert wurde, muss das Leishmaniose-Screening als experimentell angesehen werden. Dabei wurde spekuliert, dass bei Immunschwäche mit starker Erregervermehrung und einer ausreichenden Menge an eingestreuter Erreger-DNA in den Patientenseren gerechnet werden könnte und damit durch Amplifikation (= Vervielfältigung von Nukleinsäuren) von Leishmanien-DNA, ein Nachweis im peripheren Serum möglich würde. Bisher gibt es für diese Annahme noch keine Beweise.

Erregerbefunde und aufgezeichnete Zyklusschwellenwerte (Ct-Werte) der Nukleinsäureamplifikationen im Rahmen dieses Screening-Ansatzes wurden mit dem immunologischen Status der Patienten korreliert. Damit soll die Studie zu einem besseren Verständnis der Epidemiologie von Leishmaniose und Schistosomiasis bei ghanaischen HIV-Patienten beitragen, da sowohl Schistosomen als auch Leishmanien im westafrikanischen Ghana weit verbreitet sind. Über ihr lokales Vorkommen bei immungeschwächten Personen ist jedoch wenig bekannt.

Aus diesem Grund bedarf es hierbei einer näheren Betrachtung, um Zusammenhänge zwischen einer Immunsuppression und einer parasitären Infektion besser verstehen und ggf. Rückschlüsse auf weitere Verbindungen schließen zu können.

Leishmaniasis

Die Verursacher der Leishmaniasis, die Leishmanien gehören zu den Protozoen (Flagellaten) und werden mittels Sandmücken (*Phlebotomus* spp. bzw. *Lutzomyia* spp.) als Vektoren übertragen. Der Mensch ist nur ein Zwischenwirt und kann bei einer Infektion mit dem obligat intrazellulären Erreger das Krankheitsbild der Leishmaniose entwickeln, benannt nach dem Erstbeschreiber William Boog Leishman. Bei der Leishmaniose werden drei Verlaufsformen unterschieden: die kutane, die mukokutane und die viszerale.

Die Ausbreitung erstreckt sich über die Mittelmeerregion, Zentral- und Südwestasien, Afrika sowie Süd- und Mittelamerika. Pro Jahr treten schätzungsweise eine Million Infektionen weltweit auf, wobei es hierbei zu 20.000 bis 30.000 Todesfällen kommt [WHO, Fact Sheet Leishmaniasis].

Bei der kutanen Leishmaniose – oder auch „Orient-Beule“ – kommt es bevorzugt zu einzelnen bis multiplen roten Maculae und Papeln, die sich zu einer zentral ulzerierenden Beule weiterentwickeln können. Sie kann spontan ausheilen; dies kann allerdings bis zu zwei Jahre dauern und geht oft mit Narbenbildungen einher.

Die aufgrund der Lokalisation, sowohl kutan als auch die Schleimhäute betreffend, ernstere Verlaufsform wird als mukokutane Leishmaniose bezeichnet und führt bei Superinfektionen komplikativ zu destruierten Strukturen insbesondere im Gesichtsbereich und ggf. Beeinträchtigung der Schluckfähigkeit, was weitere Folgen mit sich bringt.

Die gefährlichste Form ist hingegen die viszerale Leishmaniose, auch Kala-Azar („Schwarzes Fieber“) genannt, die unbehandelt häufig zum Tod führt. Ihre Symptome sind sehr variabel und unspezifisch, sodass sie häufig erst spät erkannt wird und durch Befall des Knochenmarks zu einer Immunsuppression und schwerwiegenden Ko-Infektionen führen kann.

Um eine adäquate Therapie einleiten zu können, sollte eine Feststellung des Subtyps erfolgen. Bei der kutanen und mukokutanen Form werden hierfür Proben aus den Hauteffloreszenzen entnommen und anschließend mikroskopisch, mittels Kultur oder molekularbiologisch mittels PCR, untersucht. Bei der PCR-Diagnostik besteht eine hohe Sensitivität, allerdings kann diese nur in speziell dafür geeigneten Laboren durchgeführt werden.

Im Falle eines Verdachtes auf eine viszerale Leishmaniose werden Proben aus dem peripheren Blut oder durch Knochenmarksaspiration gewonnen. Aufgrund der Praktikabilität werden Knochenmarksuntersuchungen meist erst bei negativem Blutbefund unternommen.

Je nach Erkrankungsmaß, Lokalisation und Leishmanienspezies wird eine lokale oder systemische Therapie angewandt (z.B. mit Amphotericin B oder Miltefosin).

Es existieren für die Leishmaniose weder eine Impfung noch eine Chemoprophylaxe. Auch besteht weiterhin keine Meldepflicht einer Infektion für Ärzte oder Labore.

Schistosomiasis

Die Schistosomiasis oder auch Bilharziose wiederum ist eine Wurmerkrankung, die durch Saugwürmer (genauer: *Schistosoma* = Pärchenegel) verursacht wird. Beim Lebenszyklus spielen Süßwasserschnecken und der Mensch als Zwischenwirte die wichtigste Rolle.

Schätzungsweise sind min. 230 Millionen Menschen weltweit infiziert, wobei die chronische Variante hierbei dominiert [Colley et al., 2014]. Jährlich kommt es aufgrund von organbezogenen Komplikationen zu bis zu 200.000 Todesfällen [WHO, Fact Sheet Schistosomiasis].

Das Vorkommen ist hauptsächlich auf das tropische und subtropische Afrika beschränkt, selten wird die Erkrankung auch in Südamerika, Südostasien und auf der arabischen Halbinsel beobachtet.

Beim Menschen führen Wurmeier während ihrer Wanderung oder Ablagerung in Geweben aufgrund einer Immunreaktion zu Entzündungen und schlussendlich zu Fibrosierungen betroffener Organe. Damit einhergehende organbezogene Symptome sind oft eher unspezifisch, aber für die Erkrankung typisch, da hauptsächlich die Leber, Harnblase/-wege, Nieren, Darm und Lunge betroffen sind. Häufig allerdings bleiben sowohl die akute als auch die chronische Verlaufsform asymptomatisch.

Initial kann es im Bereich der Eintrittsstellen der Zerkarien in die Haut zu Hypersensitivitätsreaktionen und somit zu einer Dermatitis – auch Badedermatitis oder Zerkariendermatitis genannt – kommen.

Eine akute Schistosomiasis (Katayama-Syndrom) tritt bei einer systemischen Hypersensitivitätsreaktion auf die Antigene der Schistosoma auf, sodass unspezifische Allgemeinsymptome vorkommen. Diese klingen in den meisten Fällen spontan nach 2-10 Wochen ab. Schwerere Verläufe mit weiteren Beschwerden sind möglich.

Die chronische Verlaufsform ist hingehend die Immunreaktion der nicht ausgeschiedenen Wurmeier mit Bildung von Granulomen, welche meist erst nach Jahren auftreten.

Diagnostischer Goldstandard ist der mikroskopische Nachweis von vitalen Wurmeiern im Urin oder Stuhl. Eine weitere Möglichkeit ist der PCR-Nachweis von Schistosomen-DNA oder der Nachweis von parasitenspezifischen Antikörpern im Serum.

Die Pärchenegel sind mit Praziquantel gut behandelbar und Organveränderungen sind bei adäquater Therapie zum Teil reversibel. Re-Infektionen sind allerdings in Endemiegebieten häufig. Letale Folge hat eine Infektion meist nur durch ihre Spätfolgen wie Karzinome oder Sekundärinfektionen.

Präventive Maßnahmen beruhen meist auf Aufklärung der Bevölkerung in Endemiegebieten und Verbesserung der hygienischen Bedingungen. In bestimmten Risikogruppen wird allerdings auch die präventive Gabe von Praziquantel empfohlen. Auch für die Schistosomiasis gibt es weder eine Impfung noch eine Meldepflicht für Ärzte oder Labore.

2.2. Material und Methoden

Studienpopulation

In dieser Studie wurden 1.083 Serumproben von überwiegend HIV-positiven Patienten (980) und zum kleinen Teil von HIV-negativen ghanaischen Blutspendern (103) genutzt.

Es wurden folgende Parameter im Rahmen vorheriger Studien erhoben: Alter, Geschlecht, HIV-Status und immunologische Situation – ausgedrückt durch CD4+-Lymphozytenzahl, durch das CD4+/CD8+-Verhältnis und die Viruslast [Eberhardt et al., 2015, Sarfo et al., 2015]. Etwa 75% der gesamten Proben kamen von weiblichen und nur etwa 25% von männlichen Patienten. Dabei lag das mittlere Alter bei $40 \pm 9,5$ Jahren bei den HIV-positiven Patienten und bei $33 \pm 12,3$ Jahren bei den HIV-negativen Probanden [Sarfo et al., 2015].

Die Proben wurden konstant bei -80°C gelagert.

Diagnostisches Verfahren

Zunächst wurde für die nachfolgende Nukleinsäureextraktion die gemäß Hersteller einzusetzende cRNA-Stammlösung („RNA Stock Solution“) mittels cRNA und 310 μl AVE-Buffer-Lösung hergestellt. Diese wurden in 45 μl -Portionen bei -20°C gelagert. Für die Aufreinigung wurde die vorbereitete Stammlösung mit 705 μl AVE-Buffer 10x resuspendiert. Anschließend erfolgte die Nukleinsäure-Extraktion. Diese wurde unter Verwendung des „EZ1 Virus Mini Kit v2.0 Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) auf einem automatisierten „EZ1 Advanced System“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Dieses Verfahren wurde bereits mehrfach erfolgreich durchgeführt [Tanida et al., 2021]. Zuvor wurde den Proben eine

10 µl 10⁻⁷ Phocid-Herpes-Virus (PhHV)-Sequenz als Plasmid hinzugefügt, wodurch eine kombinierte Extraktions- und Hemmkontrollbewertung ermöglicht wurde [Niesters et al., 2001]. Die aufgetauten Serumproben wurden 15 Sekunden gevortext und danach kurz bei 14.000 G für 5 Sekunden anzenrifugiert. Das „EZ1 Advanced System“ wurde gemäß der Herstellerangaben vorbereitet und bestückt [Internetseite EZ1® Advanced Handbuch, 2008]. Jeweils 50 µl der verwendungsfertigen Stammlösung wurde in die dafür vorgesehenen Elusion-Tubes transferiert. Zu den 400 µl der Serumproben wurden jeweils 10 µl der kombinierten Extraktions- und Hemmkontrolle (PhHV 10⁻⁵) hinzugefügt. Anschließend wurden die erzeugten Eluate zentrifugiert und in neue Eppendorfcups überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Magnetic Beads mitpipettiert wurden. Die Proben wurden daraufhin bei -20°C gelagert.

Die aufgereinigten DNA-Eluate wurden im weiteren Verlauf durch bereits etablierte und veröffentlichte Protokolle [Tanida et al., 2021, Frickmann et al., 2021] zum Nachweis spezifischer DNA für Leishmanien und Schistosomen genutzt. Die PCR-Assays wurden auf „RotorGene Q Cyclern“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit den offen zugänglichen veröffentlichten Protokollen durchgeführt. Für den Nachweis von Leishmanien wurde eine Zielsequenz für die Leishmanien-spezifische kDNA eingesetzt [Mira et al., 2004]. Der Nachweis von Schistosomen erfolgte für den *Schistosoma mansoni*-Komplex mittels Nachweis der CFPD (cell-free parasite DNA)/*Sm1-7* [Frickmann et al., 2021]. Für *Schistosoma haematobium* wurde die *S. haematobium*-Komplex-spezifische *Dra1* Sequenz als Zielstruktur genutzt. Zum Ausschluss falsch negativer PCR-Ergebnisse wurden die Proben während des Aufreinigungsprozesses mit PhHV-Plasmiden (Phocid-Herpes-Virus) versetzt. Die Zusammensetzung und Konzentration der PCR-Ansätze wurde vor der Probenbearbeitung mittels des speziell angefertigten Kontrollplasmides getestet. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen der Forward/Reverse Primer sowie der Sonden getestet, um bestmögliche Ergebnisse bei der Detektion der verschiedenen Fluoreszenzen zu erhalten.

Jeder Lauf wurde von einer plasmidbasierten Positivkontrolle und einer wasserbasierten Negativkontrolle in PCR-Qualität begleitet. Durch die Untersuchung unter Standardbedingungen, die mit der diagnostischen Routine des Labors identisch sind, wurde eine standardisierte Qualität sichergestellt.

In diesem Ansatz wurde neben den Primern und Sonden des *Schistosoma haematobium*-Komplexes und *Schistosoma mansoni*-Komplexes auch die Primer und Sonden für den Nachweis von PhHV-DNA genutzt. Dadurch entstand eine Triplex-PCR.

ZIEL	MENGE	REAGENZ	KONZENTRATION
	10,00 µl	HotStarTaq Mastermix	2x
	1,8 µl	MgCl ₂	50 mM
	0,75 µl	H ₂ O	
<i>Schistosoma haematobium</i> -Komplex	0,20 µl	Primer Forward	50 pmol/µl
	0,20 µl	Primer Reverse	50 pmol/µl

	0,20 µl	Sonde Primer	30 pmol/µl
<i>Schistosoma mansoni</i> -Komplex	0,20 µl	Primer Forward	50 pmol/µl
	0,20 µl	Primer Reverse	50 pmol/µl
	0,20 µl	Sonde Primer	30 pmol/µl
	0,40 µl	Primer Forward	6 pmol/µl
Phocides Herpes Virus (PhHV) als Extraktions-/Inhibitionskontrolle	0,40 µl	Primer Reverse	6 pmol/µl
	0,40 µl	Sonde Primer	8 pmol/µl
	0,05 µl	BSA	2 mg/ml
	5,00 µl	DNA	
Insgesamt	20,00 µl		

Tab. 1: Zusammensetzung des Einzelansatzes zum Nachweis von *Schistosoma haematobium*-Komplex DNA, *Schistosoma mansoni*-Komplex DNA und PhHV-DNA.

PRIMER	SEQUENZ		
<i>Schistosoma haematobium</i> Forward	5´	GATCTCACCTATCAGACGAAAC	3´
<i>Schistosoma haematobium</i> Reverse	5´	TCACAACGATACGACCAAC	3´
<i>Schistosoma haematobium</i> Target	5´	JOE-TGTTGGTGAAGGCCTGTTTGCAA-BHQ1	3´
<i>Schistosoma mansoni</i> Forward	5´	CCACGCTCTCGCAAATAATCT	3´
<i>Schistosoma mansoni</i> Reverse	5´	CAACCGTTCTATGAAAATCGTTGT	3´
<i>Schistosoma mansoni</i> Target	5´	FAM-TCCGAAACCACTGGACGGATTTTATGAT-BHQ1	3´

Tab. 2: Sequenzen der *Schistosoma haematobium*-Komplex Primer nach Cnops et. al. 2013 und *Schistosoma mansoni*-Komplex Primer nach Wichman et. al. 2009.

Im HotStarTaq Mastermix wurde eine Gesamtkonzentration des Magnesiumchlorids von 6 mM eingestellt.

Die Sonden zum Nachweis der *S. haematobium* spezifischen Dra1-Sequenz wurden mit dem Farbstoff JOE gekoppelt. Die Fluoreszenzwellenlänge lag bei 557 ± 5 nm. Zum Nachweis der *S. mansoni* CFPD (SM1-7) Sequenz wurde die Sonde an FAM gekoppelt, das bei einer Wellenlänge von 510 ± 5 nm detektiert werden kann. Die Sonde zum Nachweis der Inhibitionskontrolle PhHV DNA wurde mit Cy5.5 gekoppelt, dessen Fluoreszenz bei 660 ± 10 nm detektiert werden kann. Die PCR wurde auf „RotorGene Q Cyclern“ durchgeführt. Die PCR wurde mit einer 15-minütigen Denaturierungsphase bei 95°C gestartet. Es liefen insgesamt 40 Zyklen mit 15 Sekunden bei 95°C zur Denaturierung und 60 Sekunden bei 65°C zu Annealing und Extension ab. Dabei wurde ein Touchdown für 11 Zyklen mit $0,5^\circ\text{C}$ genutzt. Der Lauf wurde mit einer 10-sekündigen Hold-Phase bei 40°C beendet.

Der Einzelansatz zum Nachweis von Leishmanien-DNA in den Serumproben hatte den Aufbau einer Einzel-PCR.

ZIEL	MENGE	REAGENZ	KONZENTRATION
	10,00 µl	HotStarTaq Mastermix	2x
	0,60 µl	MgCl ₂	50 mM

	6,80 µl	H ₂ O	
Leishmanien	0,20 µl	Primer Forward	15 pmol/µl
	0,20 µl	Primer Reverse	15 pmol/µl
	0,20 µl	Sonde Primer	6 pmol/µl
	2,00 µl	DNA	
Insgesamt	20,00 µl		

Tab. 3: Aufbau des Einzelansatzes zum Nachweis von Leishmanien.

PRIMER	SEQUENZ		
Leishmanien Forward Primer	5'	CTTTTCTGGTCTCCGGGTAGG	3'
Leishmanien Reverse Primer	5'	CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA	3'
Leishmanien Target Primer	5'	FAM-TTTTCGCAGAACGCCCTACCCGC-BHQ-1	3'

Tab. 4: Sequenzen der Leishmanien-Primer nach Mira et al. 2004.

Im HotStarTaq Mastermix wurde eine finale Gesamtkonzentration des Magnesiumchlorids von 3 mM eingestellt.

Die Sonde zum Nachweis der Leishmanien-spezifischen kDNA wurde mit FAM markiert, das bei einer Wellenlänge von 510±5 nm detektierbar ist. Die Sonde zum Nachweis der Inhibitionskontrolle PhHV wurde auch bei diesem Ansatz mit Cy5.5 gekoppelt, dessen Fluoreszenz bei 660±10 nm detektiert werden kann.

Die PCR wurde mit einer 15-minütigen Denaturierungsphase bei 95°C begonnen. Es wurden insgesamt 45 Zyklen mit 15 Sekunden bei 95°C Denaturierung und 60 Sekunden bei 55°C Annealing und Extension durchgeführt. Der Lauf wurde mit einer 20-sekündigen Hold-Phase bei 40°C beendet.

Statistische Auswertung

Hierbei wurden drei Aspekte genauer betrachtet. Zum einen wurde die erfasste PCR-Positivrate der Stichproben aus der Ashanti Region von Leishmanien und zwei unterschiedlichen Schistosomen-Spezieskomplexen (*S. mansoni*-Komplex und *S. haematobium*-Komplex) bewertet und in das Verhältnis zu Alter, Geschlecht, HIV-Status und des immunologischen Status gebracht. Weiterhin wurde eine an die diagnostische Genauigkeit angepasste Prävalenzschätzung durchgeführt [Hahn et al., 2020, Rogan et al., 1978].

Als letzter statistischer Aspekt wurde eine mögliche Korrelation zwischen den immunologisch relevanten Parametern, hier der CD4+-Lymphozytenzahl und der HIV-Last, und den erfassten erregerspezifischen Ct-Werten untersucht. Die Berechnungen wurden mit der Software „Stata/IC 15.1 für Mac 64-Bit Intel“ (College Station, TX, USA) durchgeführt.

Ethik

Die ethische Freigabe für diese Studie wurde vom „Committee on Human Research der Kwame Nkrumah University of Science and Technology in Kumasi“ in Ghana (CHRPE/AP/12/11) und der Ethikkommission des „Medical Council“ in Hamburg (PV3771)

erteilt. Alle Studienteilnehmer unterschrieben eine schriftliche Einverständniserklärung zur weiteren Untersuchung des Probenmaterials.

2.3. Ergebnisse

Qualitative und quantitative Ergebnisse

Von 1.083 verwendeten Serumproben mussten 4 aufgrund von PCR-Inhibition von der weiteren Bewertung ausgeschlossen werden, somit wurden insgesamt 1.079 Proben analysiert. Von diesen Serumproben wurden 36 (3,4%) positiv auf den *S. mansoni*-Komplex getestet. Lediglich in 5 (0,5%) Serumproben konnte der *S. haematobium*-Komplex mittels PCR nachgewiesen werden. In keiner der 1.079 Proben wurde Leishmanien-DNA detektiert.

Die errechnete Prävalenz für den Nachweis der Schistosomenspezies auf Basis von präzisionsangepassten Prävalenzschätzungen nach Rogan & Gladen/ Gart & Buck [Hahn et al., 2020, Rogan et al., 1978, Gart et al., 1966] lag bei 3,6% für den *S. mansoni*-Komplex und bei 0,5% für den *S. haematobium*-Komplex.

Der Ct-Wert lag im Mittel bei 31,5 (SD: 2,2, Minimum: 24,1, Maximum: 35,7) für den *S. mansoni*-Komplex und bei 31,6 (SD: 1,4, Minimum: 30,1, Maximum: 34,1) für den *S. haematobium*-Komplex. Für die Signifikanzberechnung wurden der t-test und der exakte Test nach Fisher für die Untersuchung des ersten Zusammenhanges, sowie der Mann-Whitney-U Test, für den zweiten Zusammenhang genutzt.

Zusammenhang von Alter, Geschlecht und HIV-Status mit positiven PCR-Ergebnissen

Es zeigt sich, dass jüngeres Alter mit einem positivem PCR-Ergebnis für Schistosomen allgemein ($p=0,0165$) sowie mit der Spezies *S. haematobium* ($p=0,004$), aber nicht mit der Spezies *S. mansoni* ($p=0,1432$) signifikant assoziiert war.

Bei den Serumproben der männlichen Probanden zeigte sich eine signifikante Häufung von *S. mansoni* ($p=0,003$) und den Schistosomen allgemein ($p=0,003$). Weiterhin konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen HIV-Infektionen und *S. mansoni* ($p=0,042$) gezeigt werden. Da alle *S. mansoni*-Infektionen bei HIV-positiven Patienten auftraten, gab es eine schwache Signifikanz für eine Assoziation von *S.-mansoni*-Infektionen und der HIV-Positivität. Solche Zusammenhänge waren jedoch weder für *S. haematobium* noch für die Schistosomen allgemein nachweisbar.

Zusammenhang der HIV-Viruslast, CD4+-T-Zellzahl und CD4+/CD8+-Ratio mit PCR-positiven Ergebnissen

Hier konnte ein schwacher Zusammenhang zwischen einer höheren HIV-Viruslast und den Schistosomen allgemein ($p=0,0382$) und *S. haematobium* ($p=0,0374$), aber nicht *S. mansoni* ($p=0,1263$) gezeigt werden.

Eine reduzierte CD4+-T-Zellzahl war signifikant assoziiert mit dem Nachweis von Schistosomen allgemein ($p=0,0002$), *S. mansoni* ($p=0,0017$) und *S. haematobium*

($p=0,0094$). Ein niedriges CD4+/CD8+-Verhältnis war lediglich mit PCR-Positivität für *S. haematobium* ($p=0,013$) vergesellschaftet.

Zusammenhang des Cycle Threshold (Ct) mit der HIV-Viruslast und der CD4+-T-Zellzahl

Es zeigte sich eine signifikant positive Korrelation zwischen den Ct-Werten der positiven *S. haematobium*-Serumproben und der Viruslast ($\rho=1, p<0,001$). Ein Hinweis für eine negative Korrelation zeigte sich hingegen für die Ct-Werte von *S. mansoni* und die HIV-Viruslast ($\rho=-0,4697, p=0,0051$).

2.4. Diskussion

In dieser Studie sollten die Zusammenhänge zwischen systemischen Schistosomen-Infektionen sowie Leishmanien-Infektionen und dem HIV-Status einer ghanaischen Studienpopulation aus der Ashanti-Region untersucht werden. Dabei war ein Großteil der Proben der ghanaischen Studienpopulation frei von Schistosomen- und Leishmanien-DNA.

Es wurde nur ein geringer, im einstelligen Prozentbereich, Anteil an positiven Nachweisen von Schistosomen-DNA beobachtet. Dabei zeigte sich eine schwache Assoziation von HIV-Positivität und aktiven *S. mansoni*-Infektionen. Diese Assoziation ging auf Genusebene allerdings schnell verloren, wenn die Ergebnisse des *S. haematobium*-Screenings hinzugefügt wurden. Daraus wurde geschlossen, dass der HIV-Status, wenn überhaupt, nur ein schwacher Prädiktor für Schistosomen-Infektionen in Ghana ist. Diese Assoziation ist sogar noch schwächer als der beobachtete Zusammenhang mit dem männlichen Geschlecht und einem jüngeren Alter.

Unter Fokussierung auf HIV-spezifische Infektions- und Immunparameter wurden schwache Zusammenhänge einer höheren Viruslast, einer niedrigeren CD4+-T-Zellzahl und eines niedrigeren CD4+/CD8+-Verhältnisses mit Schistosomiasis auf Genusebene beobachtet. Die Signifikanz war jedoch gering und ging auf der Spezies-Ebene bei tendenziell uneinheitlichem Vorzeichen wieder verloren.

Die beobachtete positive Korrelation zwischen Ct-Werten der *S. haematobium*-Komplex-PCR und der HIV-Viruslast, was auf Assoziationen zwischen niedriger Parasitämie und hoher Virämie hindeutet, ist schwer zu interpretieren. Da das Phänomen für den *S. mansoni*-Komplex nicht reproduzierbar war, ist ein mathematischer Effekt bei geringer *S. haematobium*-Komplex-Fallzahl hier wahrscheinlich. Eine relevante Auswirkung der HIV-Positivität auf die gemessenen Ct-Werte erscheint dabei als nicht sehr wahrscheinlich.

Diese Studie hat einige Einschränkungen. Aufgrund der bekannten ungleichmäßigen geografischen Verteilung der Schistosomiasis in Ghana [Lyons et al., 1974, Szela et al., 1993, Ntajal et al., 2021, Yirenya-Tawiah et al., 2011, Aryeetey et al., 2000, Scott et al., 1982, Bozdech et al., 1972, Wolfe, 1967, Wagatsuma et al., 2003, McCullough, 1957, Bogoch et al., 2017, Klumpp & Chu, 1980, Rosei et al., 1966, Amankwa et al., 1994, Wen & Chu, 1984, Anyan et al. 2019] sind Rückschlüsse auf die daraus resultierende niedrige Prävalenz

erschwert. Große Effektstärken koinzidenter HIV-Infektionen wären jedoch höchstwahrscheinlich nicht unentdeckt geblieben. Zweitens war die Krankengeschichte zur Entwurmungstherapie der Studienpopulation nicht verfügbar. Die Häufigkeit früherer therapeutischer Interventionen könnte eine schwer zu kontrollierende Verzerrungsquelle sein. Drittens war der ungleiche Anteil von HIV-positiven und HIV-negativen Studienteilnehmern ein Zufallseffekt, der sich aus der Zusammensetzung der vorangegangenen Studien [Eberhardt et al., 2015, Sarfo et al., 2015] ergab, aus denen das in die Analysen einbezogene Residualprobenmaterial für diese retrospektive Bewertung einbezogen wurde. Dementsprechend konnten keine Fallzahlschätzungen zur Bestätigung hypothetischer Effektstärken durchgeführt werden und die Studie ist als explorativ bzw. hypothesenbildend anzusehen. Auch zwischen akuten und chronischen Infektionen wurde anamnestisch nicht unterschieden. Weiterhin ist eine mögliche Degradation der DNA aufgrund des Alters der Proben (ca. 10 Jahre) nicht auszuschließen. Dies hätte einen Einfluss auf die Prävalenzabschätzung. Aufgrund der konstanten Lagerung bei -80°C wird das Risiko jedoch als gering eingeschätzt.

Zusätzlich zeigen sich saisonale Schwankungen von parasitären Erkrankungen. So steigen beispielsweise die Infektionsraten von Schistosomen während der Regenzeit und sinken während Trockenperioden in Ghana [Wrable et al., 2019]. Dies lässt sich durch größere Brutstätten im Sinne von Süßwassergewässern und damit verbundenem Lebensraum der Süßwasserschnecken erklären, welche als Zwischenwirt ein essentieller Bestandteil des Lebenszyklus von Schistosomen spielen. Kommt es nun regional zu langfristigen Klimaveränderungen mit bestimmten Einzelphänomenen, wie zum Beispiel der Veränderung der Passatwinde, kann dies in einem solch sensiblen und komplexen System zu verstärkten Regenfällen in bestimmten Gebieten führen. Dies könnte langfristig gesehen potentiell starke Auswirkungen auf künftige Infektionserkrankungen und deren Ausbreitung haben [Universität Hamburg, Internetseite Warnsignal Klima]. Dies zeigt, dass mit Hintergrund des herrschenden Klimawandels weltweit eine bedenkenswerte Forschungsnotwendigkeit diesbezüglich besteht. Trotz der oben genannten Einschränkungen lieferte die Studie erste Einblicke in mögliche Zusammenhänge zwischen Schistosomen-Infektionen und dem HIV-Status in der Ashanti Region. Dabei deuten allerdings die Studienergebnisse nur auf schwache Assoziationen hin, was den Einfluss anderer Faktoren als den HIV-Status auf Schistosomen-Infektionen sehr wahrscheinlich macht.

Diese gering signifikanten Anzeichen möglicher Zusammenhänge zwischen Schistosomen-Infektion und ungünstigen Faktoren wie hoher Viruslast und reduzierter CD4+-T-Zellzahl sind nur als hypothesenbildend zu betrachten und sollten durch prospektive Studien mit hinreichender Fallzahl bestätigt oder ggf. auch widerlegt werden.

3. Zusammenfassung

3.1. Deutsche Zusammenfassung

In dieser Studie sollten Zusammenhänge zwischen dem HIV-Status von Patienten aus Ghana und möglichen Schistosomen- und Leishmanien-Infektionen untersucht werden. Da in Afrika HIV-Infektionen und parasitäre Erkrankungen weiterhin eine große Rolle spielen, stellte sich die Frage von potentiellen Wechselwirkungen. Somit wurde ein Echtzeit-PCR-basiertes Screening auf DNA-Sequenzen aus dem Schistosomen- und Leishmanien-Genom durchgeführt. Hierfür wurden 1.079 Serumproben von HIV-positiven und HIV-negativen Probanden untersucht mit dem Ergebnis, dass zwar keine Leishmanien-DNA nachgewiesen werden konnte, aber 36 (3,4%) Proben positiv auf *S. mansoni*-Komplex DNA und 5 (0,5%) Proben positiv auf *S. haematobium*-Komplex DNA getestet wurden. Anschließend wurden mit entsprechenden Patienteninformationen versucht, Assoziationen zwischen Schistosomen-Infektion und anderen Parametern zu folgern. Dabei zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem männlichen Geschlecht und jüngerem Alter zu besagter Infektion, aber nicht mit dem HIV-Status. Eine schwache Assoziation von Bilharziose mit erhöhter Viruslast, reduzierter CD4+ T-Zellzahl und reduziertem CD4+/CD8+-Quotienten konnte beobachtet werden, ging aber im Falle einer Stratifizierung auf Spezieskomplexebene verloren. Daher wird der Schluss gezogen, dass andere Faktoren als der HIV-Status die Wahrscheinlichkeit von Schistosomen-Infektionen bei ghanaischen Patienten zu größerem Maße beeinflussen.

3.2 Englische Zusammenfassung

The aim of this study was to investigate interactions between the HIV status of infected patients from Ghana and possible schistosoma and leishmania infections. Since HIV infections and parasitic diseases continue to play a major role in African countries, the question of potential interactions arose. Therefore, a real-time PCR-based screening for DNA sequences from the genome of schistosomes and leishmania was carried out. Finally, 1,079 serum samples from both HIV-positive and HIV-negative subjects were examined with the result that, although no Leishmania DNA could be detected, 36 (3.4%) serum samples tested positive for *S. mansoni* complex DNA and 5 (0.5%) serum samples tested positive for *S. haematobium* complex DNA. Subsequently, based on appropriate information from the patients, associations between schistosome infection and other parameters were attempted to be inferred. This approach showed an association between male sex as well as younger age and the schistosoma infection, while such an association was not generally seen for the HIV status.

A weak significance for an association of schistosomiasis with increased viral load, reduced CD4+ T-cell count and a reduced CD4+/CD8+ quotient was observed, but it was lost when stratified at species complex level. It was therefore concluded that factors other than the HIV status are more likely to influence the likelihood of schistosome infection in Ghanaian patients.

4. Abkürzungsverzeichnis

AIDS = Acquired Immunodeficiency Syndrome = Erworbenes Immundefizienz-Syndrom

BSA = Bovines Serumalbumin

CD4/8+-T-Zellen = Cluster of Differentiation 4/8-T-Zellen (bestimmte T-Lymphozyten)

Ct = Cycle Threshold = Zyklusschwellenwert

DNA = Desoxyribonucleic Acid = Desoxyribonukleinsäure

Et al. = et alia = und andere

HIV = Human Immunodeficiency Virus = Humanes Immundefizienz-Virus

L. = *Leishmania*

MgCl₂ = Magnesiumchlorid

PCR = Polymerase Chain Reaction = Polymerase-Kettenreaktion

PhHV = Phocides Herpes Virus = Phocid Herpes-Virus

RNA = Ribonucleic Acid = Ribonukleinsäure

S. = *Schistosoma*

Sp. = Spezies

Spp. = Spezies (Plural)

WHO = World Health Organization

5. Literaturverzeichnis

Akuffo, R.; Wilson, M.; Sarfo, B.; Attram, N.; Mosore, M.T.; Yeboah, C.; Cruz, I.; Ruiz-Postigo, J.A.; Boakye, D.; Moreno, J.; Anto, F. Prevalence of Leishmania infection in three communities of Oti Region, Ghana. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021, *15*, e0009413.

Akuffo, R.; Sanchez, C.; Chicharro, C.; Carrillo, E.; Attram, N.; Mosore, M.T.; Yeboah, C.; Kotey, N.K.; Boakye, D.; Ruiz-Postigo, J.A.; Moreno, J.; Wilson, M.; Sarfo, B.; Anto, F. Detection of cutaneous leishmaniasis in three communities of Oti Region, Ghana. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021, *15*, e0009416.

Akuffo, R.; Wilson, M.; Sarfo, B.; Dako-Gyeke, P.; Adanu, R.; Anto, F. Insecticide-treated net (ITN) use, factors associated with non-use of ITNs, and occurrence of sand flies in three communities with reported cases of cutaneous leishmaniasis in Ghana. *PLoS One* 2021, *16*, e0261192.

Amankwa, J.A.; Bloch, P.; Meyer-Lassen, J.; Olsen, A.; Christensen, N.O. Urinary and intestinal schistosomiasis in the Tono Irrigation Scheme, Kassena/Nankana District, upper east region, Ghana. *Trop. Med. Parasitol.* 1994, *45*, 319-323.

Anyan, W.K.; Abonie, S.D.; Aboagye-Antwi, F.; Tettey, M.D.; Nartey, L.K.; Hanington, P.C.; Anang, A.K.; Muench, S.B. Concurrent *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infections in a peri-urban community along the Weija dam in Ghana: A wake up call for effective National Control Programme. *Acta Trop.* 2019, *199*, 105116.

Aryeetey, M.E.; Wagatsuma, Y.; Yeboah, G.; Asante, M.; Mensah, G.; Nkrumah, F.K.; Kojima, S. Urinary schistosomiasis in southern Ghana: 1. Prevalence and morbidity assessment in three (defined) rural areas drained by the Densu river. *Parasitol. Int.* 2000, *49*, 155-163.

Boakye, D.A.; Wilson, M.; Kweku, M. A review of leishmaniasis in west Africa. *Ghana Med. J.* 2005, *39*, 94-97.

Bogoch, I.I.; Koydemir, H.C.; Tseng, D.; Ephraim, R.K.D.; Duah, E.; Tee, J.; Andrews, J.R.; Ozcan, A. Evaluation of a Mobile Phone-Based Microscope for Screening of *Schistosoma haematobium* Infection in Rural Ghana. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2017, *96*, 1468-1471.

Bozděch, V. Incidence of schistosomiasis in the urban population of Accra, Ghana. *Folia Parasitol. (Praha)* 1972, *19*, 171-174.

Brooks JT, Kaplan JE, Holmes KK, Benson C, Pau A, Masur H. HIV-associated opportunistic infections - going, going, but not gone: the continued need for prevention and treatment guidelines. *Clin Infect Dis.* 2009;48(5):609-611).

Cissé, M.; Zida, A.; Diallo, A.H.; Marty, P.; Aoun, K. Épidémiologie de la leishmaniose cutanée en Afrique de l'Ouest : revue systématique. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 2020, 113, 24-34.

Colley et al.: Human schistosomiasis. In: *The Lancet*. Band 383, Nummer 9936, 2014, doi: 10.1016/S0140-6736(13)61949-2.

Eberhardt, K.A.; Sarfo, F.S.; Dompok, A.; Kuffour, E.O.; Geldmacher, C.; Soltau, M.; Schachscheider, M.; Drexler, J.F.; Eis-Hübinger, A.M.; Häussinger, D.; Bedu-Addo, G.; Phillips, R.O.; Norman, B.; Burchard, G.D.; Feldt, T. *Helicobacter pylori* Coinfection Is Associated With Decreased Markers of Immune Activation in ART-Naive HIV-Positive and in HIV-Negative Individuals in Ghana. *Clin. Infect. Dis.* 2015, 61, 1615-1623.

Frickmann, H.; Lunardon, L.M.; Hahn, A.; Loderstädt, U.; Lindner, A.K.; Becker, S.L.; Mockenhaupt, F.P.; Weber, C.; Tannich, E. Evaluation of a duplex real-time PCR in human serum for simultaneous detection and differentiation of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infections - cross-sectional study. *Travel Med. Infect. Dis.* 2021, 41, 102035.

Fryauff, D.J.; Hanafi, H.A.; Klena, J.D.; Hoel, D.F.; Appawu, M.; Rogers, W.; Pupilampu, N.; Odoom, S.; Kweku, M.; Koram, K.; Wilson, M.D.; Raczniak, G.; Boakye, D. Short report: ITS-1 DNA sequence confirmation of *Leishmania major* as a cause of cutaneous leishmaniasis from an outbreak focus in the Ho district, southeastern Ghana. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006, 75, 502-504.

Gart, J.J.; Buck, A.A. Comparison of a screening test and a reference test in epidemiologic studies. II. A probabilistic model for the comparison of diagnostic tests. *Am. J. Epidemiol.* 1966, 83, 593-602.

Hahn, A.; Podbielski, A.; Meyer, T.; Zautner, A.E.; Loderstädt, U.; Schwarz, N.G.; Krüger, A.; Cadar, D.; Frickmann, H. On detection thresholds-a review on diagnostic approaches in the infectious disease laboratory and the interpretation of their results. *Acta Trop.* 2020, 205, 105377.

Hof H, Schlüter D, Hrsg. Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie, Tab. F.3.3 humanmedizinisch relevante Leishmanien, 8., unveränderte Auflage, 2022. Stuttgart: Thieme ISBN 978-3-13-244317-4.

Hoffmann, T.; Carsjens, I.; Rakotozandrindrainy, R.; Girmann, M.; Randriamampionona, N.; Maïga-Ascofaré, O.; Podbielski, A.; Hahn, A.; Frickmann, H.; Schwarz, N.G. Serology- and Blood-PCR-Based Screening for Schistosomiasis in Pregnant Women in Madagascar-A Cross-Sectional Study and Test Comparison Approach. *Pathogens* 2021, 10, 722.

Klumpp, R.K.; Chu, K.Y. Importance of the aquatic weed *Ceratophyllum* to transmission of *Schistosoma haematobium* in the Volta Lake, Ghana. *Bull. World Health Organ.* 1980, 58, 791-798.

Kwakye-Nuako, G.; Mosore, M.T.; Duplessis, C.; Bates, M.D.; Puplampu, N.; Mensah-Attipoe, I.; Desewu, K.; Afegbe, G.; Asmah, R.H.; Jamjoom, M.B.; Ayeh-Kumi, P.F.; Boakye, D.A.; Bates, P.A. First isolation of a new species of *Leishmania* responsible for human cutaneous leishmaniasis in Ghana and classification in the *Leishmania enriettii* complex. *Int. J. Parasitol.* 2015, 45, 679-684.

Kweku, M.A.; Odoom, S.; Puplampu, N.; Desewu, K.; Nuako, G.K.; Gyan, B.; Raczniak, G.; Kronmann, K.C.; Koram, K.; Botero, S.; Boakye, D.; Akuffo, H. An outbreak of suspected cutaneous leishmaniasis in Ghana: lessons learnt and preparation for future outbreaks. *Glob. Health Action* 2011, 4, doi: 10.3402/gha.v4i0.5527.

Lyons, G.R. Schistosomiasis in north-western Ghana. *Bull. World Health Organ.* 1974, 51, 621-632.

McCullough, F.S. The distribution of human schistosomiasis and the potential snail hosts in Ghana. *West. Afr. Med. J.* 1957, 6, 87-97.

Mira, J.A.; Corzo, J.E.; Rivero, A.; Macias, J.; De Leon, F.L.; Torre-Cisneros, J.; Gomez-Mateos, J.; Jurado, R.; Pineda, J.A. Frequency of visceral leishmaniasis relapses in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2004, 70, 298-301.

Niesters, H.G. Quantitation of Viral Load Using Real-Time Amplification Techniques. *Methods* 2001, 25, 419–429.

Ntajal, J.; Evers, M.; Kistemann, T.; Falkenberg, T. Influence of human-surface water interactions on the transmission of urinary schistosomiasis in the Lower Densu River basin, Ghana. *Soc. Sci. Med.* 2021, 288, 113546.

Nzelu, C.O.; Kato, H.; Puplampu, N.; Desewu, K.; Odoom, S.; Wilson, M.D.; Sakurai, T.; Katakura, K.; Boakye, D.A. First detection of *Leishmania tropica* DNA and *Trypanosoma* species in *Sergentomyia* sand flies (Diptera: *Psychodidae*) from an outbreak area of cutaneous leishmaniasis in Ghana. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014, 8, e2630.

QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden, EZ1® Advanced Handbuch: <https://www.qiagen.com/jp/resources/download.aspx?id=9987c05f-a8a9-4707-b26e-9ceda94ca398&lang=de-DE>, Mai 2008.

Rogan, W.J.; Gladen, B. Estimating prevalence from the results of a screening test. *Am. J. Epidemiol.* 1978, 107, 71-76.

Rosei, L.; McCullough, F.S.; Odei, M.A. Bilharziasis in the Brong Ahafo Region of Ghana. *West. Afr. Med. J.* 1966, 15, 75-79.

Rüppel, Joachim 2001: Armut und Aids – eine tödliche Verbindung. In: Petermanns Geographische Mitteilungen, 145, Nr.3. Gotha: Justus Perthes Verlag Gotha GmbH. 46-53.

Sadlova, J.; Vojtkova, B.; Becvar, T.; Lestinova, T.; Spitzova, T.; Bates, P.; Volf, P. Host competence of the African rodents *Arvicanthis neumanni*, *A. niloticus* and *Mastomys natalensis* for *Leishmania donovani* from Ethiopia and *Mundinia* sp. from Ghana. *Int. J. Parasitol. Parasites. Wildl.* 2019, 11, 40-45.a.

Sarfo, F.S.; Eberhardt, K.A.; Dompok, A.; Kuffour, E.O.; Soltau, M.; Schachscheider, M.; Drexler, J.F.; Eis-Hübinger, A.M.; Häussinger, D.; Oteng-Seifah, E.E.; Bedu-Addo, G.; Phillips, R.O.; Norman, B.; Burchard, G.; Feldt, T. *Helicobacter pylori* Infection Is Associated with Higher CD4 T Cell Counts and Lower HIV-1 Viral Loads in ART-Naïve HIV-Positive Patients in Ghana. *PLoS One* 2015, 10, e0143388.

Schulz, Uwe / Köbrich, Kilian 2002: Kinder und HIV/AIDS – Ursachen, Auswirkungen und Chancen der Prävention. In: Holm, Karin / Schulz, Uwe 2002: Kindheit in Armut weltweit. Opladen: Leske + Budrich. 321-343.

Scott, D.; Senker, K.; England, E.C. Epidemiology of human *Schistosoma haematobium* infection around Volta Lake, Ghana, 1973-75. *Bull. World Health Organ.* 1982, 60, 89-100.

Szela, E.; Bachicha, J.; Miller, D.; Till, M.; Wilson, J.B. Schistosomiasis and cervical cancer in Ghana. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 1993, 42, 127-130.

Tanida, K.; Balczun, C.; Hahn, A.; Veit, A.; Nickel, B.; Poppert, S.; Scheid, P.L.; Hagen, R.M.; Frickmann, H.; Loderstädt, U.; Tannich, E. Comparison of Three In-House Real PCR Assays Targeting Kinetoplast DNA, the Small Subunit Ribosomal RNA Gene and the Glucose-6-Phosphate Isomerase Gene for the Detection of *Leishmania* spp. in Human Serum. *Pathogens* 2021, 10, 826.

Universität Hamburg, Warnsignal Klima: <https://www.klima-warnsignale.uni-hamburg.de>, Gesundheitsrisiken, Kapitel 3.2.1 von Jakob P. Cramer Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin Hamburg, 2014 (Zugriff am 24.03.2023).

Villinski, J.T.; Klena, J.D.; Abbassy, M.; Hoel, D.F.; Puplampu, N.; Mehta, S.; Boakye, D.; Raczniak, G. Evidence for a new species of *Leishmania* associated with a focal disease outbreak in Ghana. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008, 60, 323-327.

Wagatsuma, Y.; Aryeetey, M.E.; Nkrumah, F.K.; Sack, D.A.; Kojima, S. Highly symptom-aware children were heavily infected with urinary schistosomiasis in southern Ghana. *Cent. Afr. J. Med.* 2003, 49, 16-19.

Wen, S.T.; Chu, K.Y. Preliminary schistosomiasis survey in the lower Volta River below Akosombo Dam, Ghana. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1984, 78, 129-133.

Wilmink T., Ursachen von HIV/AIDS Epidemien im subsaharischen Afrika aus systemischer Sicht. Bewältigungsstrategien von UNAIDS., 2008.

Wolfe MS. Urinary schistosomiasis in Ghana: a report of 53 cases, with special reference to pyelographic and cystoscopic abnormalities. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1967, 61, 90-99.

World Health Organization: Fact Sheet Leishmaniasis: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (Stand Januar 2023), Zugriff am: 11.02.2023.

World Health Organization: Fact Sheet Schistosomiasis: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis> (Stand Februar 2023), Zugriff am: 26.03.2023.

World Health Organization: WHO Technical Report Series No. 949: Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010.

Wrable, M.; Kulinkina, A.V.; Liss, A.; Koch, M.; Cruz, M.S.; Biritwum, N.K.; Ofosu, A.; Gute, D.M.; Kosinski, K.C.; Naumova, E.N. The use of remotely sensed environmental parameters for spatial and temporal schistosomiasis prediction across climate zones in Ghana. *Environ. Monit. Assess.* 2019, *191(Suppl 2)*, 301.

Yirenya-Tawiah, D.; Amoah, C.; Apea-Kubi, K.A.; Dade, M.; Ackumey, M.; Annang, T.; Mensah, D.Y.; Bosompem, K.M. A survey of female genital schistosomiasis of the lower reproductive tract in the volta basin of Ghana. *Ghana Med. J.* 2011, *45*, 16-21.

6. Erklärung des Eigenanteils

Die Arbeit wurde am Fachbereich Tropenmedizin des Bundeswehrkrankenhauses Hamburg am Bernhard-Nocht-Institut Hamburg unter Betreuung von Herrn PD Dr. Ralf Matthias Hagen sowie Herrn Prof. Dr. Hagen Frickmann durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof Dr. Hagen Frickmann, Andreas Hahn und Dr. Kirsten A. Eberhardt.

Die Durchführung der Aufreinigung und PCR sowie die Erfassung der Daten erfolgte mit fachlicher Unterstützung durch die o.g. Betreuer, sowie der Mitarbeiter:innen des Fachbereichs Tropenmedizin Annett Michel und Dr. Felix Weinreich und durch mich persönlich.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Unterstützung durch Prof. Dr. Hagen Frickmann und PD Dr. Andreas Hahn.

An dem verfassten Artikel hatte ich als Erstautor einen wesentlichen Anteil.

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

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt meinem Ehemann und größtem Unterstützer dieser Arbeit Dr. Felix Weinreich. Er wusste mich in den richtigen Momenten zu motivieren, war für mich da und hat immer an mich geglaubt. Als Mitarbeiter zu der Zeit der diagnostischen Aufarbeitung der Proben hat er mich in enger Zusammenarbeit mit Annett Michel tatkräftig unterstützt. Diese beiden Personen standen mir stets mit Rat und Tat zur Seite, wofür ich ihnen sehr dankbar bin.

Herrn Oberfeldarzt Prof. Dr. Hagen Frickmann, dem klinischen Direktor der Abt. XXI Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Bundeswehrkrankenhaus Hamburg, danke ich für die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit, sowie für die produktive wissenschaftliche Zusammenarbeit. Seine Anregungen und kritischen Kommentare haben zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Oberstarzt PD Dr. Ralf Matthias Hagen, dem klinischen Direktor der Abt. XXI Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz, für die Vergabe dieses interessanten Promotionsthemas und als meinem Dissertationsbetreuer bedanken, sowie bei meinem UKE-Co-Betreuer Prof. Dr. Holger Rohde, Ltd. Oberarzt am Institut für Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich herzlich für ihre fortwährende Unterstützung und Begleitung in jedem Abschnitt meines Lebens.

Ohne diese zahlreiche Unterstützung wäre diese Promotionsarbeit nicht zustande gekommen.

8. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

9. Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

Datum:

Unterschrift: