



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

Programa de doctorado en Medicina

**ALTERACIONES ECOGRÁFICAS
SECUNDARIAS A ESQUISTOSOMIASIS
URINARIA EN UN ÁREA DE ALTA
ENDEMIAS**

Tesis presentada por

CRISTINA BOCANEGRA GARCÍA

Para optar al grado de Doctora

Director: Israel Molina Romero

Tutor: Carles Pigrau Serrallach

Julio de 2018

Israel Molina Romero, Director del Programa de Salud Internacional del Instituto Catalán de la Salud y Médico Adjunto del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Vall d'Hebron

Y

Carles Pigrau Serrallach, Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona y Jefe Clínico del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Vall d'Hebron

Certifican que la tesis titulada:

“Alteraciones ecográficas secundarias a esquistosomiasis urinaria en un área de alta endemicia”

Que presenta la licenciada **Cristina Bocanegra García** ha sido realizada bajo su dirección en el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Vall d'Hebron, la consideran finalizada y autorizan su presentación para que sea defendida ante el tribunal que corresponda

Dr. Israel Molina Romero

Dr. Carles Pigrau Serrallach

En Barcelona, a 17 de Julio de 2018

A mi familia

“Yo soy porque nosotros somos”

Nadie está a favor del sufrimiento.

Pero qué se hace cuando se está en contra de algo es lo que marca la diferencia

Martín Caparrós

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es un trabajo colectivo que no sería posible sin el esfuerzo de muchas personas. No puedo pensar en ninguna de ellas que no haya puesto, además de profesionalidad y rigor, toda su ilusión y corazón en él. Y esto se nota. Pienso en todo el camino que ha llevado hasta aquí y siento cariño y alegría. Hemos disfrutado muchísimo haciendo este trabajo y el aprendizaje ha sido enorme, a nivel científico pero sobre todo a nivel vital. Nos ha enfrentado a la realidad de muchas personas que no pueden vivir de espaldas a la enfermedad. Nos ha mostrado el valor de lo que hacemos. Nos ha hecho trabajar durante horas larguísimas, sin dudar nunca de que vale la pena. Nos ha hecho conscientes de lo que verdaderamente importa, de que necesitamos mucho menos de lo que creemos que necesitamos. Ha unido a personas muy diferentes con el objetivo común de mejorar algunas cosas, de hacer de este mundo un lugar un poco más amable. Hemos aprendido que puede hacerse, pero sobre todo que tenemos que hacerlo juntos.

Y claro, empiezo por Israel, instigador principal de este trabajo como de muchos otros. Ya son muchos años de aventuras juntos (y los que nos quedan) y nunca deja de sorprenderme su aptitud para sacar lo mejor de las personas y para llevar adelante lo que se propone. Su visión tan amplia de la realidad y su capacidad constante para emocionarse con las cosas pequeñas, y con una buena cena. En estos años, incluso a miles de kilómetros de distancia, siempre me he sentido acompañada y cuidada. Entiende cosas que no son fáciles de entender, aunque no se las explique. Me ha hecho crecer. Y además, nos reímos. Nos reímos mucho.

Gracias a Sara. La primera imagen que me viene a la mente cuando pienso en este trabajo es Sara montada en una moto, emocionada contando todo lo que había pasado en tal escuela, con su caja llena de muestras. Ya han pasado algunos años desde que empezó todo, pero sé que no soy la única que piensa en Sara cuando lo recuerda. En Cubal aún la llaman la doctora tchitokoto y ruegan que vuelva pronto. Sara es una guerrera, y no puedo estar más orgullosa de tenerla cerca. A Zeferino por hacérmelo todo siempre tan fácil. Por sus ganas infinitas de aprender, por su honestidad y por el cuidado con el que hace todo lo que hace. Por su calma. No sé si es consciente de todo lo que yo he aprendido de él. A Jacobo, mi epidemiólogo de cabecera, probablemente la persona que más se alegra de que esta tesis esté llegando a su fin. Yo no sé qué haré

sin él. A los directores de escuela, profesores, padres y alumnos que participaron en todo este trabajo, por su entusiasmo y compromiso. A Xavier Serres, por sembrar la semilla de todo esto y amenizarnos con sus fados a dúo con Custodia.

No recuerdo qué esperaba cuando viajé la primera vez a Cubal. Cuando viajo ahora sé que me sentiré en casa. Esto es posible gracias a todas las personas que me acogieron con los brazos abiertos y a las que admiro muchísimo. Que se han convertido en amigos muy queridos. Son muchas más, pero quiero agradecer especialmente su cariño a Arlette y Dada, a Raquel, a Zacarías, a Pesela, a Agostinho y Siltinha, a Verónica, a Milagros, a Teresa y a Generosa. Y a mi familia cubalense: Acacia y mis ahijados.

Me considero muy afortunada por haber trabajado a lo largo de los años con compañeros excelentes en todos los sentidos. Personas con las que comparto proyectos, inquietudes y una visión particular de la vida, y que durante diferentes etapas me han alegrado el día a día. Soy consciente de que es algo excepcional. Gracias a todos y en particular a Marisa, a Nano, a Elena, a Lluís, a Eva, a Claudia, a Lupe, a Francesc y a todos los compañeros de Drassanes. A Albert, que fue mi primer jefe y me enseñó su pasión por su profesión; más tarde entendí que es reflejo de la pasión por la vida.

Gracias a Xulián y a Puma, por abrirme su casa para hacer de los días en los que escribí esta tesis unos días felices. A mis amigos, simplemente por hacer mi vida mejor, por llenarla de risa y de seguridad. No podría desear mejores amigos. Vosotros ya sabéis quiénes sois. Gracias a mis padres, por permitirme crecer en una casa llena de libros. A mi madre, por mostrarme cada día que la curiosidad, la sorpresa y la maravilla llenan el mundo, y por empujarme a él. A Raúl, Oli y Leo, por enseñarme a buscar la esencia de las cosas y dejar aparte todo lo demás, por formar parte de mi hogar sea donde sea y por esa sonrisa maravillosa hacia el futuro. Por haber aprendido la palabra esquistosomiasis y habérmela devuelto llena de sentido.

ABREVIATURAS

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

DALYs: Años de vida perdidos por discapacidad (del inglés disability-adjusted life years)

IL: Interleucina

Linfocitos Th: Linfocitos T cooperadores (del inglés T-helper)

OMS: Organización Mundial de la Salud

POC-CCA: Test de detección de antígenos catódicos circulantes (del inglés point-of-care circulating cathodic antigen)

UCP-LF CAA: Test de detección ultrasensible por conversión de fósforo-flujo lateral de antígenos anódicos circulantes (del inglés ultrasensitive converting phosphor lateral flow circulating anodic antigen)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

LAMP: Técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (del inglés loop-mediated isothermal amplification)

MDA: Administración masiva de medicamentos (del inglés mass-drug administration)

CI: Intervalo de confianza

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

IFN- γ : Interferón gamma

ERR: Tasa de reducción de huevos (del inglés egg-reduction rate)

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	9
2. INTRODUCCIÓN.....	11
2.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA ESQUISTOSOMIASIS.....	11
2.1.1 Epidemiología global y carga de enfermedad.....	11
2.1.2 Distribución geográfica.....	13
2.1.3 Epidemiología en Angola. Cubal.....	14
2.2 ASPECTOS CLÍNICOS DE LA ESQUISTOSOMIASIS.....	15
2.2.1 Ciclo biológico.....	15
2.2.2 Patogenia.....	17
2.2.3 Clínica.....	18
2.2.4 Diagnóstico.....	20
2.2.5 Tratamiento.....	21
2.3. LA ECOGRAFÍA EN LA ESQUISTOSOMIASIS.....	23
3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	25
3.1 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	25
3.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	26
4. OBJETIVOS.....	27
4.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	27
4.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	27
5. ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	28

<i>5.1 ARTÍCULO 1</i>	28
<i>5.2 ARTÍCULO 2</i>	28
6. RESULTADOS	29
7. DISCUSIÓN	31
8. LIMITACIONES	43
9. CONCLUSIONES	45
10. LÍNEAS DE TRABAJO FUTURAS	46
11. BIBLIOGRAFÍA	48
12. ANEXO	61

1. RESUMEN

La esquistosomiasis es una enfermedad parasitaria dentro del grupo de las denominadas “enfermedades desatendidas”. Se estima que unos 240 millones de personas están infectadas en todo el mundo. En el Hospital Nossa Senhora da Paz, situado en el municipio de Cubal, Angola, donde se realizó la presente tesis doctoral, la esquistosomiasis urinaria es una patología frecuente. Sin embargo, la epidemiología concreta, los factores de riesgo para su adquisición o la carga de enfermedad eran desconocidas.

En esta tesis se incluyen dos estudios ecográficos que analizan el nivel de morbilidad secundaria a esquistosomiasis presente en el municipio. Estudian además el papel del análisis de orina mediante tiras reactivas como posibles marcadores de gravedad y los cambios evolutivos de todos estos parámetros tras la realización de tratamiento. Los hallazgos principales indican que se trata de una zona con una de las cargas de enfermedad en relación a esquistosomiasis urinaria de las más elevadas descritas en África Subsahariana, que la tira reactiva de orina, y principalmente los niveles de proteinuria mayores de 300 mg/dL permiten predecir la presencia de lesiones de gravedad, y que a los seis meses del tratamiento las lesiones revierten de forma muy significativa, pero no desaparecen por completo.

Cabe destacar que ambos trabajos se basan en el artículo incluido en el anexo, realizado por parte del mismo equipo y publicado anteriormente a la inscripción en el programa de doctorado. Se trata del estudio epidemiológico inicial, que tiene como hallazgo principal la detección de una prevalencia de esquistosomiasis urinaria muy elevada (del 61%) en escolares, que califica al municipio como de alto riesgo para el desarrollo de complicaciones, según la Organización Mundial de la Salud, y por tanto es tributario del inicio de forma inmediata de medidas preventivas.

Summary

Human schistosomiasis is a parasitic disease within the group of so-called "neglected diseases". It is estimated that roughly 240 million people are infected worldwide. In the Hospital Nossa Senhora da Paz, located in the municipality of Cubal, Angola,

where the present document was carried out, urinary schistosomiasis is a frequent diagnosis. However, the epidemiology in the area, the risk factors for its acquisition or the burden of disease in the area were unknown.

This thesis includes two sonographic studies that analyze the level of morbidity secondary to schistosomiasis present in the city. They also study the role of urine analysis using reactive strips as possible markers of severity and the evolution of all these parameters after the completion of treatment. The main findings indicate that it is an area with one of the highest burden of disease in relation to urinary schistosomiasis in sub-Saharan Africa; it shows also that urine dipsticks, and mainly proteinuria levels greater than 300 mg / dL, are useful to predict the presence of severe lesions; after six months of treatment the lesions revert in a very significant way, but they do not disappear completely.

It is noteworthy that both works are based on the article included in the annex, made by the same team and published previously to the inscription in the doctoral program. This is the initial epidemiological study, which has as its main finding the detection of a very high prevalence of urinary schistosomiasis (61%) in schoolchildren, which qualifies the municipality as high risk for the development of complications, according to the World Health Organization, and therefore is tributary of the immediate start of preventive measures.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Epidemiología de la esquistosomiasis

2.1.1 Epidemiología global y carga de enfermedad

La esquistosomiasis es una enfermedad parasitaria producida por el tremátodo *Schistosoma sp.* Existen tres especies principales causantes de esquistosomiasis en humanos: *S. mansoni*, *S. haematobium* y *S. japonicum*. Otras especies con importancia humana aunque con mayor restricción geográfica son *S. guineensis*, *S. intercalatum* y *S. mekongi*. De ellas, *S. haematobium* es la responsable de la esquistosomiasis genito-urinaria, mientras que el resto de especies causan la esquistosomiasis intestinal (1).

Es una de las enfermedades parasitarias más prevalentes en todo el mundo. Se estima que aproximadamente 240 millones de personas están infectadas, y de ellas unos 20 millones manifiestan síntomas de enfermedad grave (2). En el caso de la esquistosomiasis urinaria, estimaciones recientes apuntan a que la hematuria causada por *S. haematobium* afecta a 70 millones de personas y que unos 18 millones presentan afectación vesical significativa (3).

En las regiones endémicas la forma más frecuente de esquistosomiasis es la crónica; esta se produce por exposición repetida a la cercaria. La primoinfección ocurre normalmente en estas áreas en los primeros meses o años de vida y la carga de infección aumenta de forma exponencial a lo largo de la infancia hasta llegar al máximo nivel en los adolescentes. Posteriormente, tanto la prevalencia como la intensidad de la infección decrecen en la edad adulta; sin embargo, aproximadamente un tercio de los adultos en zonas endémicas permanecen infectados de forma activa, con excreción de huevos estable (4), probablemente en relación a factores inmunológicos o bien en subgrupos de población con contacto mantenido con las fuentes de agua dulce (figura 1).

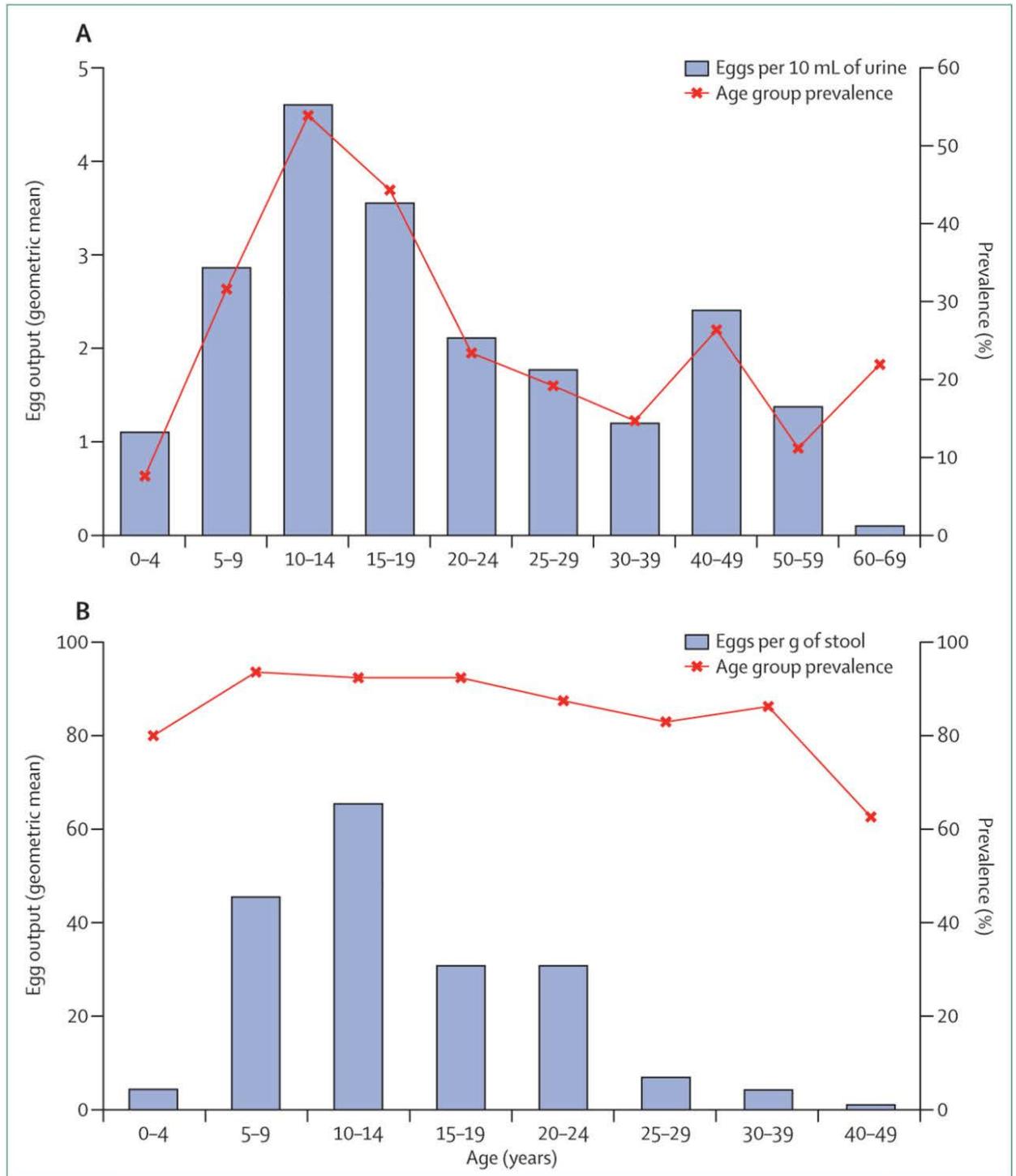


Figura 1. Curvas de prevalencia e intensidad de la infección por *S. haematobium* y *S. mansoni* en función de la edad (Fuente: De Stigter KV, King CH, Keatin CE et al. Effect of targeted mass treatment on intensity of infection and morbidity in schistosomiasis mansoni: seven year follow-up of a community in Machakos, Kenya. *Trans Assoc Am Physicians*. 1989; **102**: 209-12.)

En los últimos años se ha mostrado de forma convincente que en zonas endémicas la infección por esquistosomiasis tiene consecuencias graves en los primeros años de la vida, como anemia, dolor abdominal crónico y retraso del desarrollo psicomotor, así como alteración del estado nutricional y del sistema inmune (3, 5-9). Estas consecuencias tempranas son debidas en su mayor parte a un estado sostenido de inflamación crónica y son probablemente infradiagnosticadas en la mayoría de contextos (10, 11). La esquistosomiasis es una enfermedad muy relacionada con la pobreza y las condiciones de vida, por lo que en la mayoría de regiones en las que es endémica existen también otras enfermedades infecciosas como malaria, geohelminths, tuberculosis, VIH, neumonías y diarreas infecciosas, que en conjunto son responsables de una elevada mortalidad infantil. Su importancia global a nivel de inmunomodulación e influencia en otras patologías de la primera infancia es desconocida (12).

Actualmente, se calcula que la carga global debida a la esquistosomiasis es de 1,7-4,5 millones de años de vida ajustados por discapacidad (DALYs) en todo el mundo (13).

2.1.2 Distribución geográfica

La característica principal en cuanto a la distribución geográfica de la esquistosomiasis es su carácter focal. Dado que se relaciona con la presencia en el agua dulce de las especies de caracol capaces de actuar como huéspedes intermedios, la distribución de la enfermedad se superpone a la del hábitat de estas especies, y es frecuente que incluso poblaciones muy cercanas geográficamente tengan prevalencias de la enfermedad muy diferentes, en función de los ríos o lagos que las abastecen, flora local, velocidad de la corriente de agua, etc. Concretamente *S. mansoni* necesita de la presencia de especies de *Biomphalaria spp* y *S. haematobium* de *Bulinus spp*. *S. japonicum* utiliza los caracoles de las especies *Oncomelania spp*. como huésped intermedio.

Las especies más ampliamente distribuidas son *S. haematobium* y *S. mansoni*; ambas están presentes en amplias zonas de África y algunas zonas de Oriente Medio. *S. mansoni* es además la única especie presente en América. *S. japonicum* se localiza en Asia, principalmente en Filipinas y China. *S. mekongi* se encuentra en puntos a lo

largo de la cuenca del río Mekong, en el Sudeste Asiático; por último, *S. guineensis* y *S. intercalatum* se distribuyen en áreas de África Central y Oriental (Figura 2)

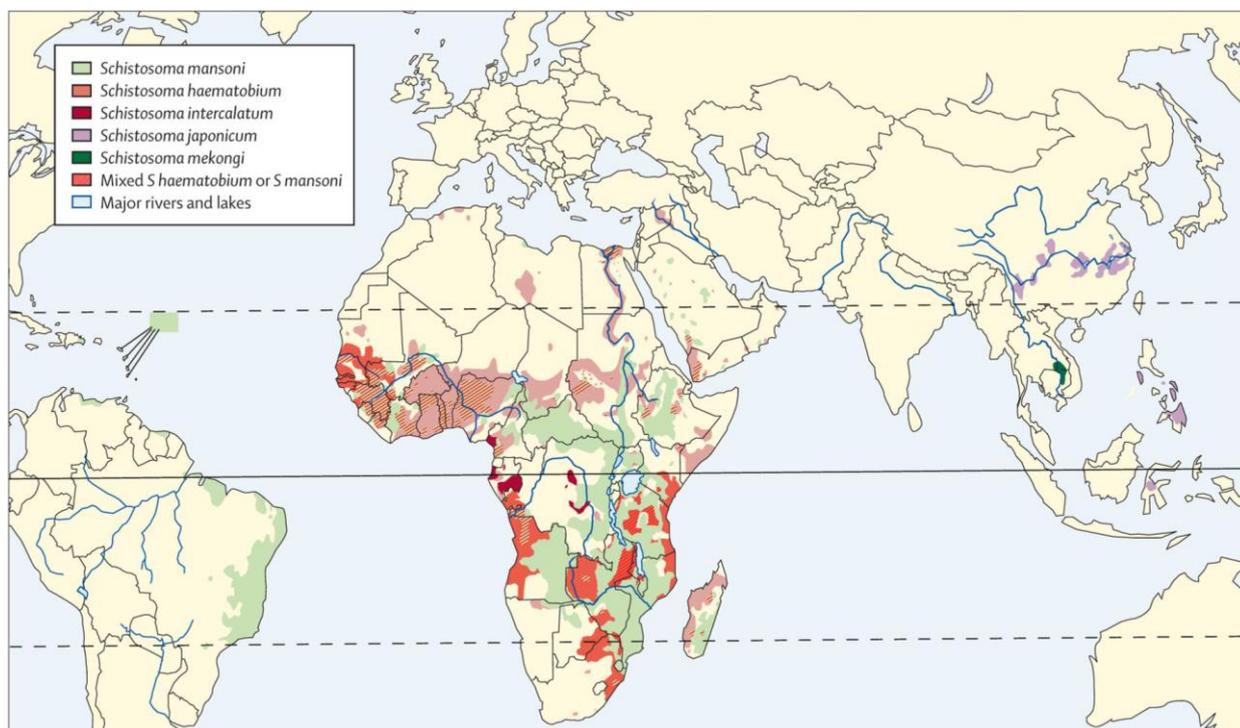


Figura 2. Distribución mundial de las diferentes especies de esquistosomiasis. (Fuente: Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *Lancet* 2014 June 28; **383** (9936): 2253-2264)

2.1.3 Epidemiología en Angola. Cubal

Angola es un país endémico para las dos principales especies de esquistosoma. En general se considera que la zona occidental del país es endémica para la especie *S. haematobium* y la zona oriental para *S. mansoni*. Las dos zonas se irrigan por cuencas hidráulicas diferentes, ya que la cordillera principal se localiza paralela a la costa y divide los ríos que desembocan en el Océano Atlántico en la parte occidental de los que desembocan en la cuenca del Okavango o en el Océano Índico en la parte oriental (14). Sin embargo, como se comentó anteriormente, la esquistosomiasis es una enfermedad predominantemente focal, y tanto la presencia de la misma como su prevalencia e intensidad de la infección varía enormemente a nivel local; este hecho hace que la realidad concreta en grandes áreas del país sea desconocida.

Concretamente, una encuesta a nivel nacional realizada en 2005 por parte del Ministerio de Salud mostró una prevalencia global de esquistosomiasis a nivel nacional del 28% (15). Esta encuesta incluía pocos municipios del país y alguna de las provincias no estaban representadas. Una encuesta más completa a nivel nacional está siendo llevada a cabo actualmente, con resultados aún no publicados.

Aparte de la encuesta del Ministerio de Salud, existe un único estudio realizado en la provincia de Bengo, en el norte de Angola, reportó una prevalencia de esquistosomiasis urinaria del 17% en niños en edad escolar; se objetivó también la presencia de esquistosomiasis intestinal, con una prevalencia menor al 1% (16).

En el municipio de Cubal, los únicos datos existentes hasta ahora se referían a esquistosomiasis urinaria y provienen de encuestas epidemiológicas de los años 70, realizados con muy escasa población e informan de una prevalencia muy variable, entre el 30 y el 85% (17).

Nuestro equipo investigador publicó en el año 2015 el primer estudio epidemiológico completo realizado en el municipio de Cubal. En él se analizaron muestras de orina y heces de niños en edad escolar del municipio, objetivándose una prevalencia de esquistosomiasis urinaria en los niños en edad escolar del municipio es del 61%; no se diagnosticaron casos de esquistosomiasis intestinal (18). Este trabajo permitió además realizar un mapa del municipio, mostrando que las prevalencias más elevadas se encuentran en los barrios más cercanos a las dos principales fuentes de agua del municipio, principalmente el río Cubal, que atraviesa el municipio y abastece a una gran parte de su población. Otro hallazgo importante fue la utilidad de las tiras reactivas de orina para el diagnóstico indirecto de esquistosomiasis urinaria, alcanzando en este contexto una sensibilidad del 96%. Este trabajo está incluido en la presente tesis doctoral como anexo.

2.2 Aspectos clínicos de la esquistosomiasis urinaria

2.2.1. Ciclo biológico

Como ya se ha comentado, *S. haematobium* es un tremátodo del género *Schistosoma* spp. Los gusanos adultos viven en los plexos venosos del sistema urinario y genital de

la persona, donde se reproducen sexualmente y producen huevos fertilizados que son eliminados a través de la orina, o retenidos en los tejidos, provocando una reacción inflamatoria a cuerpo extraño. Los huevos que son eliminados en agua dulce eclosionan, liberando un miracidio ciliado de vida libre, que es capaz de infectar a la especie de caracol apropiada para actuar como huésped intermedio. Dentro del caracol, el parásito experimenta un proceso de replicación asexual que dura entre 4 y 6 semanas, liberando finalmente decenas de miles de cercarias en el agua. La cercaria es capaz de nadar libremente, puede vivir hasta tres días en el agua dulce y es la forma infectiva para el ser humano, penetrando la piel intacta (19); una vez dentro del humano, pierde la cola, pasa al estado de esquistosómula y migra a varios tejidos dentro del organismo; en el sistema porta hepático se convierte en adulto al cabo de unas 5-6 semanas, donde las formas sexuales macho y hembra se emparejan; una vez fusionados migran a los plexos venosos del sistema genito-urinario, comenzando la fecundación y la producción de huevos (20,21) (Figura 3).

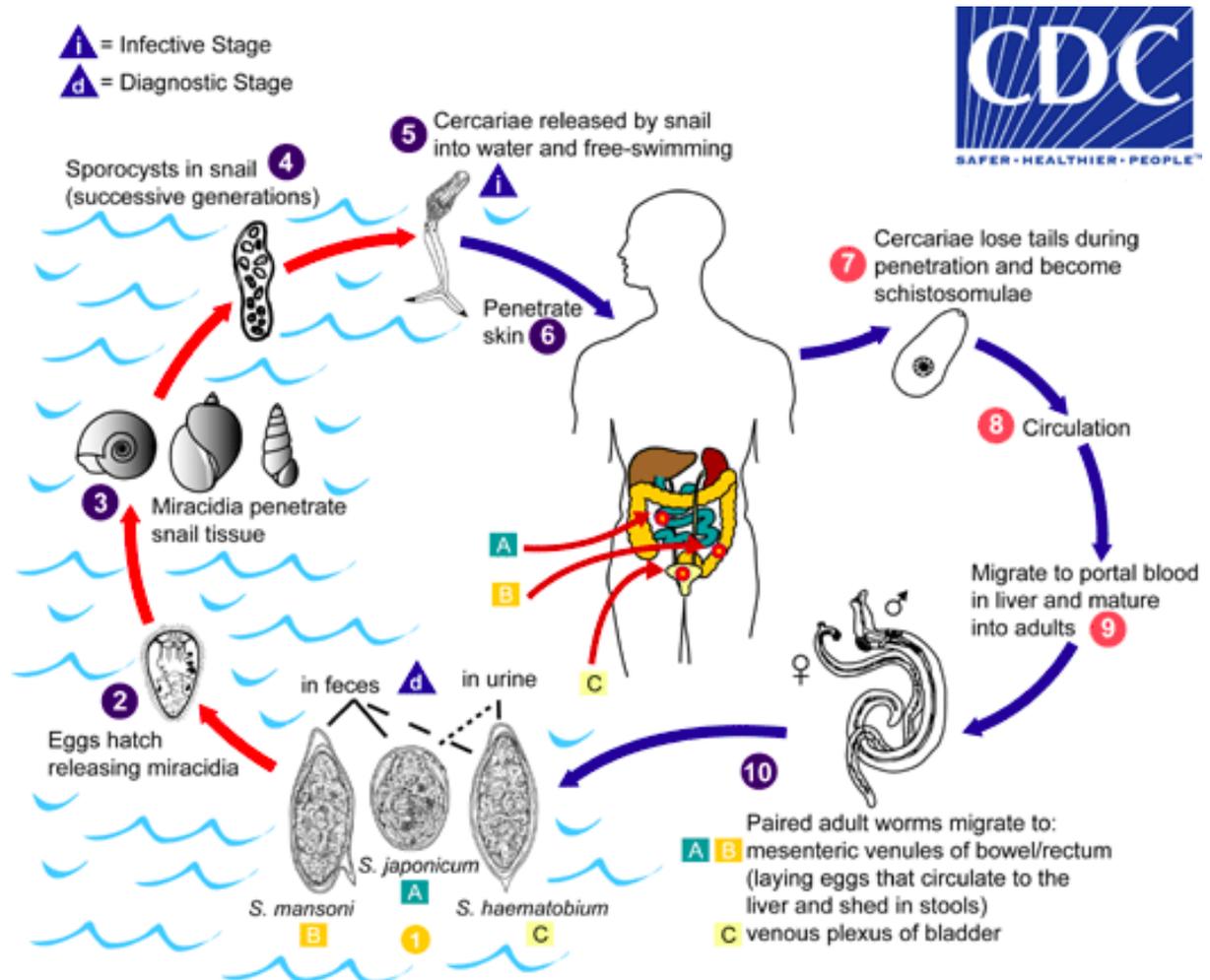


Figura 3: Ciclo biológico de *Schistosoma spp.* (Fuente: CDC)

2.2.2. Patogenia

En general se considera que la mayor parte de la morbilidad secundaria a la esquistosomiasis es causada por los huevos y no por los gusanos adultos (22). Los huevos que no son excretados permanecen atrapados en las paredes de las vías urinarias y del sistema genital, donde inducen una respuesta inmune granulomatosa caracterizada inicialmente por macrófagos activados y posteriormente por eosinófilos y linfocitos, que producen principalmente citoquinas Th2, como IL-4, IL-5, IL-13 (23). Estos granulomas contienen enzimas proteolíticos que impiden la necrosis tisular, pero induce una inflamación crónica que es la que finalmente lleva tanto a la morbilidad general como a los daños locales y a las manifestaciones clínicas a largo plazo (24).

La esquistosomiasis aguda ocurre principalmente en viajeros o inmigrantes a áreas endémicas que se exponen por primera vez a los antígenos de esquistosoma en la edad adulta. Ocurre unas semanas tras la infección en relación a una respuesta inmune muy florida a los antígenos de los huevos, con presencia de inmunocomplejos. Este cuadro recibe el nombre de síndrome de Katayama y cursa con fiebre, malestar, mialgia, cefalea, astenia y hepatomegalia. Puede asociar dificultad respiratoria y dolor abdominal y puede llegar a ser grave (25). Es muy poco frecuente en zonas endémicas, probablemente como resultado de la programación de la respuesta inmune “in útero” en bebés nacidos de madres infectadas, o de la infección en los primeros meses de vida (26,27).

2.2.3. Clínica

El signo más característico de la esquistosomiasis urogenital es la hematuria, a menudo acompañada de disuria, poliaquiuria y dolor suprapúbico (28). En áreas endémicas es tan común que en algunas regiones se considera una evolución normal del desarrollo en los niños y niñas (29).

Los cuadros más graves vienen dados por una mala regulación de la respuesta inmune contra los antígenos de los huevos (30), lo que lleva a una fibrosis crónica del tracto urinario, que puede tener como resultado un cuadro de uropatía obstructiva en forma de hidrouréter e hidronefrosis. Estas alteraciones favorecen las sobreinfecciones bacterianas y pueden llevar de forma conjunta a una disfunción renal terminal (31).

S. haematobium es reconocido por la OMS como un carcinógeno humano de categoría 1, clasificación reservada para la máxima evidencia de asociación (32, 33), a diferencia del resto de especies de *Schistosoma spp.*. Sin embargo, aunque la asociación entre la infección por *S. haematobium* y el cáncer vesical, concretamente el carcinoma de células escamosas, es fuerte, la identificación de los mecanismos subyacentes no ha sido aclarada de forma fehaciente, debido a varios factores, entre ellos la ausencia de un modelo animal tratable para estudiar la progresión de la esquistosomiasis urogenital, la escasa información genética hasta fechas recientes sobre *S. haematobium* y la falta de conocimiento sobre mutaciones específicas en el cáncer vesical humano en relación al modelo animal. En los últimos años, algunos

estudios han intentado aportar información sobre este tema, abriendo nuevas vías de investigación (34-36). Algunos mecanismos propuestos para justificar el poder carcinogénico de *S. haematobium* son la inducción directa del proceso carcinogénico mediante la actividad de moléculas del parásito en las células del huésped y la hiperproducción de oxígeno y nitrógeno reactivos por parte del sistema inmune del hospedador como parte de un proceso inflamatorio crónico, tanto en relación a una reacción a cuerpo extraño por huevos no eliminados como por infecciones bacterianas repetidas por la alteración estructural del tracto urinario (37-40). Por último, otros factores comúnmente asociados al cáncer vesical y a otros tipos de tumores, como el tabaco y la exposición a nitrosaminas y otros compuestos químicos derivados de productos utilizados en procesos industriales parecen promover el riesgo de esta asociación (41, 42).

La esquistosomiasis genital femenina es una entidad relativamente frecuente producida por *S. haematobium*. Los huevos depositados en los plexos vesicales migran al tracto genital, causando lesiones inflamatorias en los ovarios, trompas de Falopio, cuello uterino, vagina y vulva. Las lesiones conocidas como “sandy patches” (parches arenosos), que aparecen en la vagina, son patognomónicas de esta afectación; se asocian con neovascularización y corresponden a una mucosa friable, que sangra con el contacto superficial (43). Este tipo de afectación es causa de dolor crónico, infertilidad y riesgo aumentado de aborto; además favorece la infección por el virus del VIH (44,45). El tratamiento farmacológico en general no es suficiente para resolver estas lesiones y debe acompañarse de tratamiento quirúrgico. En los hombres, la esquistosomiasis genital puede manifestarse como hematospermia, orquitis, prostatitis, dispareunia y oligospermia (46).

Todas las especies de *Schistosoma spp.* causan síntomas inespecíficos pero discapacitantes, concretamente anemia, malnutrición y alteración del desarrollo infantil, como consecuencia de un proceso inflamatorio continuado durante el periodo de crecimiento (6, 48). En el caso de la anemia se suman además pérdidas crónicas de sangre (10, 49). Varios estudios han mostrado que es posible revertir estos efectos inespecíficos con el tratamiento, aunque la ventana de tiempo en la que es más efectivo y en la que el impacto sobre el desarrollo es mayor es probablemente estrecha (50, 51).

Por otra parte, la capacidad de la esquistosomiasis de modular el sistema inmune en personas que han padecido la infección en los primeros años de la vida favorece probablemente las co-infecciones con otros helmintos y agentes parasitarios como la malaria, aunque este tema no está aclarado aún, ya que los resultados de varios estudios ofrecen resultados contradictorios (52, 53). Trabajos recientes sugieren que las diferentes especies de *Schistosoma* pueden tener efectos diferentes; según estos trabajos, es posible que *S. mansoni* aumente la susceptibilidad a episodios graves de malaria, mientras que *S. haematobium* la disminuya. Esta diferencia podría deberse al paso de los esporozoitos de *Plasmodium* por un microambiente hepático alterado por la presencia de granulomas en el caso de *S. mansoni* (y no en el de *S. haematobium*) (54, 55).

Por último, la distribución de huevos de esquistosoma en localizaciones ectópicas puede llevar a cuadros clínicos atípicos; de ellos, el más frecuente es la esquistosomiasis del sistema nervioso central, por migración del parásito o de los huevos. Puede cursar como cuadro de meningoencefalitis si se depositan en el cerebro ó como una mielitis transversa o mieloradiculopatía subaguda si la migración sucede a nivel medular (56).

2.2.4. Diagnóstico

El diagnóstico de certeza de la esquistosomiasis genito-urinaria se realiza mediante la detección de huevos de *S. haematobium* en orina o en biopsias tisulares. El examen microscópico a través de filtros de policarbonato es la técnica recomendada por la OMS para estudios de campo, debido a su capacidad de cuantificar, además de la presencia o ausencia del parásito, el número de huevos por microlitro, y por tanto, la intensidad de la infección (57). La detección de microhematuria se utiliza en áreas endémicas como marcador de la infección por *S. haematobium*, pero no puede considerarse un test diagnóstico en sí mismo, ya que no es específico de esta enfermedad (58). Las pruebas serológicas tienen cierta utilidad para la detección de anticuerpos contra antígenos de esquistosoma, especialmente en el caso de viajeros sintomáticos, pero su escasa fiabilidad para diferenciar infecciones actuales de pasadas la hace poco útil en áreas endémicas (59). Las técnicas de detección de antígenos podrían superar esta dificultad; el test de detección de antígenos catódicos

circulantes (POC-CCA) presenta buena sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de *S. mansoni*, pero mucha menor rentabilidad en el caso de *S. haematobium* (60). La técnica UCP-LF CAA (test de detección ultrasensible por conversión de fósforo-flujo lateral de antígenos anódicos circulantes) parece presentar un mejor perfil para el diagnóstico de *S. haematobium*, pero aún no está comercializado y no ha sido probado a gran escala (61). En los últimos años se han desarrollado métodos moleculares basados en PCR como alternativas diagnósticas en la esquistosomiasis genito-urinaria. Estas técnicas requieren kits de PCR y termocicladores, muy costosos actualmente, así como un nivel elevado de capacitación e infraestructura, por lo que su uso en la mayoría de áreas endémicas es limitado (62, 63). Nuevas tecnologías como el LAMP (loop-mediated isothermal amplification), una técnica de PCR que permite superar, al menos parcialmente, estas dificultades, están siendo perfeccionadas en la actualidad y podrían suponer una mejora significativa en el diagnóstico de la esquistosomiasis genito-urinaria (64).

2.2.5. Tratamiento

El praziquantel es el tratamiento de elección para todos los tipos de esquistosomiasis. A pesar de que se utiliza con este fin desde hace más de 40 años, su mecanismo de acción no es completamente conocido (65). Para su eficacia correcta depende de una respuesta de anticuerpos efectiva por parte del hospedador (66). Actúa sobre los gusanos adultos, pero tiene escasa actividad contra las larvas inmaduras de esquistosoma (67). Una dosis de 40 mg/kg es efectiva para el tratamiento de *S. haematobium*; es seguro y efectivo en niños y mujeres embarazadas (65, 67, 68). Los comprimidos son de gran tamaño, tienen sabor amargo y la dosis es de 600 mg; por ello el tratamiento de los niños pequeños implica partir los comprimidos y administrarlos con bebida o alimento, y el cálculo exacto de la dosis es complicado. En los últimos años se han hecho esfuerzos para intentar comercializar un praziquantel soluble y con mejores características farmacocinéticas que mejore el tratamiento actual en este grupo de edad, y probablemente esté disponible en el mercado en los próximos años (69). Algunos efectos adversos del tratamiento son dolor abdominal, náuseas, cefalea e inestabilidad cefálica; estos efectos tienen un pico

de 2-4 horas tras la toma de la medicación y son autolimitados. La elevada carga parasitaria se correlaciona con un mayor riesgo de efectos adversos.

A pesar de la extensa utilización del praziquantel en regiones endémicas, no existe una evidencia clara de resistencias al medicamento (70). Se han descrito esquistosomas tolerantes al praziquantel, pero estas cepas no se han detectado de forma evidente en áreas endémicas (71); dado que no existen marcadores de resistencia al praziquantel, la única evidencia es el fracaso clínico y es difícil afirmar en la mayoría de los casos que un fracaso clínico sea debido a resistencia al fármaco, ya que puede deberse a la presencia de formas jóvenes, a una mala absorción o a una eficacia disminuida en pacientes con co-infecciones o con cierto grado de desnutrición (72). Sin embargo, sí que se ha demostrado que pueden inducirse resistencias de forma experimental, por lo que debe tenerse en cuenta esta posible amenaza en un fármaco que se administra en monoterapia y de forma masiva en muchas regiones endémicas (69).

Los derivados de la artemisinina, desarrollados como tratamientos antimaláricos, presentan gran eficacia contra las formas inmaduras de *Schistosoma spp.* en estudios “in vivo” y “in vitro” (73). Aunque ensayos clínicos controlados a gran escala han mostrado una utilidad limitada en tratamientos en monoterapia (74), su uso en combinación con el praziquantel podría mejorar las tasas de curación tras el tratamiento y el control de la infección. Un metaanálisis reciente mostró tasas de cura dos veces superiores tras el tratamiento con praziquantel y derivados de artemisinina en combinación comparadas con la monoterapia con praziquantel (75). Sin embargo, se necesita más investigación en farmacocinética, formulación, dosis y posibles interacciones entre ambos fármacos. Además, antes de poder establecer la utilización de esta combinación hay que tener en cuenta la posibilidad de la inducción de resistencias del parásito de la malaria a artemisininas en áreas endémicas para ambas enfermedades.

La oxamniquina es un fármaco que se utilizó a gran escala antes del desarrollo del praziquantel, pero actualmente no se encuentra fácilmente disponible; es únicamente efectivo contra *S. mansoni* y su perfil de efectos adversos es menos favorable que el del praziquantel (76).

2.3 Ecografía en la esquistosomiasis

El control de la esquistosomiasis es un reto constante para las regiones endémicas, y las dificultades para prevenir las infecciones en edades tempranas y las reinfecciones frecuentes son enormes. Varias estrategias, tales como control ambiental del hospedador intermedio, mejoras en el acceso a agua segura y educación para la salud de la comunidad son necesarias de forma combinada (77). Una de las principales estrategias de la OMS en áreas endémicas para el control de la esquistosomiasis es el control de la morbilidad secundaria a la infección mediante la administración repetida de praziquantel (78). El tratamiento se realiza mediante distribución masiva de medicamentos (MDA) y pueden seguirse diferentes abordajes en función de la prevalencia e intensidad de la infección basales, principalmente a través de las escuelas; la distribución masiva a nivel comunitario es más compleja a nivel logístico, pero puede aportar grandes ventajas al acceder a bolsas de población que podrían estar manteniendo el ciclo (76).

Aunque el objetivo principal de estos programas es el control de la morbilidad, habitualmente su eficacia se mide por sus efectos en la prevalencia e intensidad de la infección; existe una asociación entre la intensidad de la infección y la morbilidad secundaria a esquistosomiasis, pero esta correlación no es perfecta (79, 80), por lo que el conocimiento de la evolución de las lesiones internas previas y posteriores al tratamiento, teniendo en cuenta factores como la edad y la frecuencia de las reinfecciones, permitiría establecer de forma más afinada la periodicidad de la administración del praziquantel en los programas de administración masiva (81, 82). Para ello, la ecografía es un método excelente, ya que es una técnica barata, móvil, no invasiva, y con una curva de aprendizaje para el examinador relativamente rápida. Permite obtener información de forma inmediata sobre el daño interno y sobre su evolución tras el tratamiento o reinfecciones (83). En general, la ecografía es una técnica subjetiva y observador-dependiente; para superar esta dificultad la Organización Mundial de la Salud desarrolló en 1997 un protocolo estandarizado para los hallazgos ecográficos en esquistosomiasis (Protocolo de Niamey-Belo Horizonte) en el que se contabilizan los hallazgos objetivamente medibles (84). Las lesiones vesicales puntúan entre 0 y 2 en función de la lesión y de su tamaño, las ureterales entre 0 y 4 y las renales entre 0 y 8. Este protocolo es actualmente utilizado

mundialmente y permite comparar los hallazgos en diferentes regiones o momentos de forma fiable (85). En el caso de la esquistosomiasis urinaria, las lesiones más frecuentes son las irregularidades y el engrosamiento de la pared de la vejiga y las deformaciones vesicales. Las lesiones del tracto urinario superior, como la dilatación de los uréteres y la hidronefrosis, son menos frecuentes pero normalmente más graves e indican un nivel mayor de morbilidad (82,83).

3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS DE TRABAJO

3.1. Justificación del estudio

La esquistosomiasis urinaria es una enfermedad dentro del grupo considerado por la OMS como “enfermedades olvidadas” (86). Esta definición agrupa a 17 enfermedades que tienen en común el hecho de ser transmitidas principalmente en situaciones de pobreza y la escasa atención que han recibido clásicamente por este mismo motivo.

En el municipio de Cubal, en Angola (figura 4), y en concreto, en el hospital Nossa Senhora da Paz, lugar de realización de la presente tesis doctoral, la esquistosomiasis urinaria es un diagnóstico frecuente en la práctica clínica diaria. Sin embargo, la epidemiología concreta en la zona, incluyendo las tasas de prevalencia, la afectación geoespacial y la carga de enfermedad secundaria, era completamente desconocida.

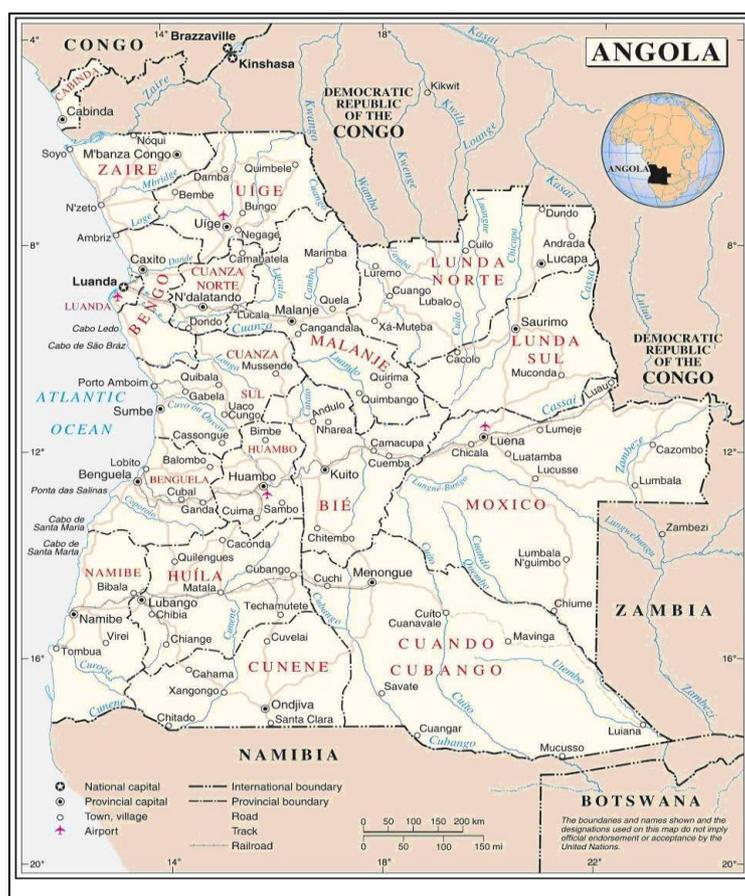


Figura 4. Mapa de Angola. El municipio de Cubal se encuentra en la región Oeste del país, en la provincia de Benguela. (Fuente: Ministerio de Saúde: www.minsa.gov.ao).

Un estudio epidemiológico inicial, incluido en el anexo, fue el primer paso para comenzar a conocer la situación respecto a la infección por *S. haematobium* en la zona. Dado que los programas de control se basan principalmente en el control de la morbilidad, se consideró necesario la realización de un estudio inicial de morbilidad, mediante la realización de ecografías reno-vesicales, según las recomendaciones de la OMS (85). Además, el estudio de morbilidad mediante marcadores indirectos, como los detectados en una tira reactiva de orina, podrían aportar grandes ventajas a la hora de priorizar recursos en un contexto de pobreza como este. Este estudio constituye el primer trabajo de la presente tesis.

Por otra parte, la dinámica de las lesiones ecográficas secundarias a esquistosomiasis urinaria y de los parámetros detectados en tiras reactivas de orina tras el tratamiento no es conocida con exactitud. Al igual que el estudio de morbilidad inicial, el determinar el tiempo tras el cual las lesiones desaparecen y reaparecen en relación con el tratamiento, es necesario para poder implantar medidas de control basadas en la evidencia. Esta brecha en el conocimiento inspiró el desarrollo del segundo trabajo.

3. 2 Hipótesis de trabajo

Los estudios epidemiológicos convencionales analizan la esquistosomiasis desde un punto de vista parasitológico. El uso de la ecografía en este contexto permite conocer, además de la presencia del parásito, datos clínicos sobre la afectación de la persona infectada, ya que analiza la presencia y gravedad de lesiones a todos los niveles del tracto urinario.

Por tanto, las hipótesis que nos han llevado a realizar este trabajo son:

- En el municipio de Cubal, Angola, la afectación clínica por la esquistosomiasis urinaria es un importante problema de salud en la edad pediátrica.
- La ecografía permite obtener información sobre las lesiones asociadas a la esquistosomiasis, tanto a nivel individual como comunitario.
- La evolución ecográfica de las lesiones tras el tratamiento etiológico con praziquantel es desconocida en la población infantil.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo principal

Obtener datos clínicos sobre la carga de enfermedad secundaria a esquistosomiasis urinaria en la edad pediátrica en el municipio de Cubal, Angola, mediante el uso de ecografía.

4.2 Objetivos secundarios

- Evaluar la utilidad de la ecografía como herramienta de diagnóstico y seguimiento de la esquistosomiasis genito-urinaria.
- Evaluar la utilidad de las tiras reactivas de orina como marcador de afectación del tracto urinario en pacientes con esquistosomiasis genito-urinaria
- Analizar el efecto del tratamiento con praziquantel sobre las lesiones ecográficas en un contexto de alta endemia de esquistosomiasis con alta tasa de reinfecciones.

5. ARTÍCULOS PUBLICADOS

5.1 Artículo 1

Título: Ultrasound findings and associated factors to morbidity in *Schistosoma haematobium* infection in a highly endemic setting.

Autores: Cristina Bocanegra García, Zeferino Pintar, Xavier Serres, Jacobo Mendioroz, Milagros Moreno, Sara Gallego, Teresa López, Antoni Soriano-Arandes, Maria Luisa Aznar, Nicolau Sikaleta, Eva Gil, Fernando Salvador, Israel Molina

Artículo publicado: Tropical Medicine and International Health 2018 Feb; 23(2):221-228. Factor de impacto 2017: 2,541

DOI: 10.1111/tmi.13020

5.2 Artículo 2

Título: Ultrasound evolution of pediatric urinary schistosomiasis after treatment with praziquantel in a highly endemic area

Autores: Cristina Bocanegra, Zeferino Pintar, Jacobo Mendioroz, Xavier Serres, Sara Gallego, Arlette Nindia, Maria Luisa Aznar, Antonio Soriano-Arandes, Fernando Salvador, Eva Gil, Nicolau Sikaleta, Milagros Moreno, Israel Molina

Artículo aceptado (pendiente de publicación): American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Factor de impacto: 2,564

6. RESULTADOS

En el primer trabajo se incluyeron 157 pacientes, con una media de edad de 8.7 (SC 3.2) años. De ellos, 86 (54.8%) eran niñas. Se encontraron alteraciones patológicas en el 85.3% de ellos: 84.7% presentaban lesiones a nivel vesical, 34.4% en el uréter y 6.3% a nivel renal. La puntuación global según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud fue 5.74. El sexo masculino [OR 2.61 (1.04-6.58); $p=0.043$] y la edad mayor de 10 años [OR 2.96 (1.17-7.46); $p=0.023$] se asociaron con mayor riesgo de presentar lesiones en las vías urinarias. Se objetivó presencia de microhematuria en 145 (92.4%) niños, hematuria macroscópica en 30 (19.1%) y proteinuria en 97 (61.7%). La presencia de hematuria macroscópica [OR 2.48 (1.11-5.58); $p=0.02$] y de proteinuria mayor de 300 mg/dL [OR 5.70 (2.17-14.94); $p<0.01$] se asociaron con anormalidades en el tracto urinario superior y mostraron buenos valores predictivos positivos y negativos para la detección de patología en el tracto urinario superior (65.5% y 71.1% respectivamente)

Este trabajo confirma que en niños afectados de esquistosomiasis urinaria pueden encontrarse patología urinaria severa desde edades muy tempranas y que la prevalencia de patología puede ser muy elevada. En un contexto de alta endemia, la microhematuria y la proteinuria son buenos marcadores de la morbilidad secundaria a la esquistosomiasis, siendo la proteinuria más precisa para alteraciones severas del tracto urinario superior.

En el segundo trabajo setenta niños que habían sido diagnosticados de esquistosomiasis urinaria durante el estudio epidemiológico realizado previamente en el municipio de Cubal y a los que se les había realizado ecografía urinaria acudieron entre seis y ocho meses más tarde para repetir el análisis de orina, tanto mediante tira reactiva de orina como microscópico, así como el estudio ecográfico. Se analizó también el cumplimiento con el consejo previo de evitar bañarse en el río.

De los 70 niños analizados, 29 (41.4%) eran niñas, con una media de edad de 10,4 años (SD 2,3). Cincuenta y tres (75,7%) presentaron mejoría de su puntuación en el tracto urinario inferior y/o superior, mientras que 12 (17,1%) no sufrieron cambios; en 5 (7,1%) casos se objetivó progresión de las lesiones. Ninguno de los parámetros analizados desapareció completamente.

Tras una dosis de tratamiento con praziquantel, todos los parámetros mostraron regresión. La mejoría fue mayor en las lesiones del tracto urinario inferior que en las del tracto superior y en los niños mayores de diez años que en los menores. Entre los parámetros no ecográficos la reducción fue menor en el caso de la proteinuria. Consideramos que la ecografía debería ser una herramienta habitual en el diagnóstico y seguimiento de la esquistosomiasis urinaria, así como la realización de un protocolo más preciso de seguimiento en aquellos casos en los que las lesiones no revierten tras el tratamiento.

7. DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta tesis es obtener datos clínicos sobre la carga de enfermedad secundaria a esquistosomiasis urinaria en la edad pediátrica en el municipio de Cubal, Angola, mediante el uso de ecografía. Como se comentó anteriormente, la ecografía permite diagnosticar las lesiones patológicas secundarias a esquistosomiasis urinaria y además comparar los hallazgos detectados, tanto entre diferentes poblaciones como en la misma población en diferentes momentos, permitiendo así conocer tanto la carga de enfermedad como la dinámica de la morbilidad por esquistosomiasis en función de la edad, reinfecciones, tratamientos realizados, etc. En este caso el segundo trabajo es precisamente una continuación del primero, por lo que se procederá a una discusión conjunta de ambos.

En esta tesis se han realizado dos trabajos ecográficos en pacientes pediátricos afectados de esquistosomiasis urinaria en el municipio de Cubal, Angola. Todos los pacientes habían sido diagnosticados durante el desarrollo de un estudio epidemiológico previo realizado por el mismo equipo investigador en el que se analizaron muestras de 1.283 escolares del municipio y se objetivó una prevalencia de esquistosomiasis urinaria del 61%. Los escolares fueron contactados a nivel comunitario en las escuelas durante las actividades habituales; se trata por tanto de una muestra poblacional aparentemente sana; esta es una característica habitual en áreas endémicas para esquistosomiasis, en las que los síntomas durante la infancia pasan desapercibidos o se consideran parte del desarrollo normal. En el momento de su realización la prevalencia de esquistosomiasis en la zona era desconocida, y por tanto el municipio no estaba incluido en las campañas de administración masiva de medicamentos ni se realizaban otras medidas preventivas. Se trata en ese sentido de unos datos iniciales con un doble valor: por un lado permiten la instauración de medidas preventivas, ya que la OMS basa la instauración de los programas de administración en masa de medicamentos en las prevalencias iniciales; por otro lado representan una situación basal que permitirá valorar la eficacia de estas medidas de control instauradas. Concretamente, una prevalencia de esquistosomiasis urinaria mayor del 50% en niños de edad escolar supone que la comunidad en su conjunto es calificada por la OMS como de alto riesgo para el desarrollo de complicaciones; en esta situación epidemiológica debe comenzarse administración masiva de praziquantel en las escuelas de forma anual.

Este trabajo está incluido como anexo en la presente tesis.

En el primer trabajo de esta tesis se describen las características ecográficas de los pacientes diagnosticados de esquistosomiasis urinaria durante el estudio epidemiológico. Se analiza además la utilidad de la tira reactiva de orina como marcador de morbilidad y su posible uso con este fin en este contexto. El segundo trabajo analiza la evolución clínica de los mismos pacientes en relación a la esquistosomiasis urinaria, tras haber realizado tratamiento y haber sido informados en relación a la fisiopatología de la enfermedad, su importancia y la forma de contagio. Se les orientó para evitar los baños en agua dulce y se les recomendó la utilización de fuentes de agua alternativas en el municipio (pozos y agua comercial principalmente). Después de un tiempo que osciló entre los 6 y los 8 meses fueron reevaluados, realizando de nuevo análisis de orina y estudio ecográfico; además se preguntó a los niños si habían cumplido con el consejo de evitar los baños de agua dulce. Dado que son trabajos claramente relacionados, creemos oportuno para mantener la coherencia realizar la discusión conjunta de ambos siguiendo un orden temporal.

Uno de los objetivos de los programas de control de esquistosomiasis en áreas endémicas es el control de la morbilidad secundaria; sin embargo, la mayoría de los estudios de eficacia de estos programas se basan únicamente en las cifras de prevalencia o de intensidad de la infección. Este trabajo mostró que el 85% de las ecografías realizadas presentaban algún tipo de alteración morfológica; además, un tercio de los niños presentaban algún tipo de lesión patológica en el tracto urinario superior, lo que corresponde a las lesiones más graves de la esquistosomiasis urinaria. Teniendo en cuenta la clasificación de la OMS, y comparando la puntuación obtenida (3,45 en el tracto urinario inferior, 2,28 en el superior y 5,74 en total) con la de otros estudios realizados en áreas endémicas, concluimos que la morbilidad en Cubal en relación a la esquistosomiasis urinaria es una de las más elevadas de África Subsahariana (87-90); únicamente algunos estudios en zonas hiperendémicas muestran resultados similares (91, 92). Además, la media de edad de los pacientes en nuestro trabajo es de 8,7 años; al ser una de las más bajas en la bibliografía (84-89), aún refuerza más la idea de la alta carga de enfermedad en esta zona.

Las lesiones más frecuentes diagnosticadas en el tracto urinario inferior fueron las irregularidades de la pared vesical, seguidas por engrosamiento de la pared vesical y

distorsión de la forma de la vejiga. Otras alteraciones detectadas a este nivel fueron masas vesicales y pseudopólipos. Estos hallazgos son consistentes con los detectados en otros estudios, aunque más frecuentes en nuestro trabajo (89, 93). Este tipo de lesiones se incluyen en el protocolo de Niamey-Belo Horizonte como lesiones “marcadoras” de enfermedad, es decir, como lesiones que muestran la presencia de esquistosomiasis (84), sin indicar necesariamente gravedad. Sin embargo, esta afirmación es polémica, ya que es difícil asegurar que estas lesiones no supongan lesiones precancerosas, principalmente debido a que a pesar de que *S. haematobium* es un carcinógeno reconocido por la OMS (33) y la evidencia epidemiológica de la asociación es firme, no existe un conocimiento robusto del proceso fisiopatológico que conduce al estadio de lesión cancerosa (94). Esto es debido posiblemente a la necesidad de procedimientos invasivos y seguimientos prolongados, que son escasamente disponibles a gran escala en la mayoría de áreas endémicas (95). Recientemente, algunos estudios han intentado aportar algo de luz en este tema, proponiendo por un lado protocolos de estudio citológico centrados en las células escamosas, ya que el análisis habitual, que incluye tanto células escamosas como transicionales, no es buen predictor de este tipo de carcinoma (96, 97), y por otro lado identificando biomarcadores que puedan ser detectados en orina en estadios iniciales curables, como la hiperplasia de células escamosas (98, 99). Revisiones recientes sugieren que estudios a gran escala con estas técnicas permitirían superar, al menos parcialmente, las dificultades para el diagnóstico precoz del carcinoma vesical asociado a *S. haematobium* (100). Por otra parte, en los últimos años se ha evidenciado de forma indiscutible la importancia de las consecuencias generales de la esquistosomiasis secundarias a un proceso de inflamación continuado (6, 47-48); en este sentido, aunque estas lesiones del tracto urinario inferior no representasen lesiones precancerosas, sí representan inequívocamente lesiones inflamatorias con consecuencias por sí mismas. Por tanto, consideramos que la afirmación de que estas lesiones no representan gravedad debería ser revisada.

Aunque las lesiones del tracto urinario superior, tradicionalmente consideradas de mayor gravedad, fueron menos frecuentes, se encontraron en un porcentaje muy elevado (aproximadamente un 40% de los casos); de ellas, la más común fue la dilatación ureteral, completa o parcial en cualquiera de sus tramos. La distorsión de la forma del uréter en su parte más distal, a la entrada de la vejiga, reviste especial

importancia, ya que en este punto condiciona de forma más directa una obstrucción al flujo de orina normal, y es por tanto, una lesión precursora de hidronefrosis. La imagen radiológica resultante de la sección intramural del uréter al visualizarse en proyección axial resulta especialmente llamativa, ya que se asemeja a una imagen de un ojo, y además de su importancia clínica, presenta utilidad divulgativa. Menos frecuente fue la afectación renal, aunque debido a su gravedad, consideramos destacable que un 6,3% de los niños presentaban algún grado de hidronefrosis. Este dato es aún más llamativo teniendo en cuenta la metodología del estudio, que fue realizado en niños “sanos” en las escuelas del municipio. Comparando nuestros datos con otras series publicadas en áreas endémicas, las lesiones del tracto urinario superior detectadas fueron más frecuentes y de mayor gravedad en nuestro caso; como ejemplos, un estudio realizado en una zona endémica de Níger, con una metodología similar, en niños en edad escolar con una media de edad de 8,7 años, diagnosticó un porcentaje de lesiones del tracto urinario superior en el 8% de los pacientes (5). En otro estudio realizado en un área hiperendémica de Madagascar, realizado en población tanto adulta como infantil, el porcentaje fue del 8,7%. Únicamente dos estudios publicados presentan unos porcentajes de lesiones en el tracto urinario superior similares, uno realizado en Kenia en pacientes entre 4 y 23 años, con un porcentaje de lesiones del 35% (101) y otro realizado en Níger en niños y adultos, en el que el porcentaje fue del 48% (102).

Esta diferencia en el grado de morbilidad asociada a esquistosomiasis con otras áreas altamente endémicas se debe probablemente a que, como se comentó anteriormente, en Cuba la epidemiología de la esquistosomiasis era previamente desconocida; además, Angola ha comenzado recientemente a reorganizar los sistemas de salud pública y de prevención tras una guerra muy prolongada, por lo que en esta zona no existía ningún tipo de programa de control y un porcentaje muy pequeño de la población tenía acceso al praziquantel. Este hallazgo refuerza la idea de la importancia de realizar el estudio ecográfico como complemento al análisis de orina en los estudios epidemiológicos, ya que permite afinar en la cuantificación de las consecuencias para la comunidad de la infección por *S. haematobium*.

En este trabajo, los niños presentaron un riesgo mayor de lesiones que las niñas, aunque esta diferencia no se observó en las lesiones del tracto urinario superior.

Diferencias entre sexos en cuanto a la prevalencia y gravedad de las lesiones han sido descritas y suelen atribuirse a diferencias en actividades recreacionales o de agricultura. En nuestro caso, aunque se trata de niños de corta edad y el contacto con el agua dulce es frecuente en ambos sexos, es posible que los niños se bañen con más frecuencia y durante más tiempo en las fuentes de agua dulce que las niñas. Otras posibilidades, como factores hormonales o anatómicos, no están bien resueltas, aunque existen varios estudios realizados en modelo animal que sugieren diferencias en la respuesta inmune, en general hacia una respuesta inflamatoria más potente en el caso masculino y una respuesta inmunomoduladora mayor en el femenino (103, 104); en este sentido, un estudio realizado en Senegal mostró que en pacientes adultos con intensidades similares de infección, las mujeres presentaban mayor aumento de IL-10, IgA y factor transformador de crecimiento β , mientras que en los hombres era mayor la elevación de TNF- α e IFN- γ (105). Por otra parte, los niños mayores de 10 años presentaron un riesgo mayor de lesiones en el tracto urinario inferior que los menores, aunque no hubo diferencias en el tracto urinario superior. Esta diferencia puede deberse a un tiempo más prolongado de contacto con el parásito. No se encontraron diferencias en cuanto a la patología por barrios o escuelas, a pesar de que en el estudio epidemiológico inicial se había constatado que la prevalencia de la infección por *S. haematobium* era mayor en los barrios más cercanos al río o a una laguna al norte del municipio. Posiblemente sea debido a la carga de enfermedad tan alta en todos los barrios.

Otro de los objetivos de este primer trabajo fue evaluar la utilidad de parámetros detectados mediante tiras reactivas de orina para predecir las lesiones en el tracto urinario. En un contexto de alta endemia y escasos medios, como es el área en la que se realizó este estudio, conocer la probabilidad de presentar lesiones graves en pacientes infectados por *S. haematobium* mediante una técnica rápida, sencilla y barata puede ser de gran interés, ya que nos permitiría discriminar aquellos pacientes que se beneficiarán en mayor medida de la realización de la ecografía y por tanto priorizar los recursos disponibles. En un nivel más general, la utilización de la tira reactiva de orina en los estudios epidemiológicos iniciales permitiría obtener una idea indirecta de la carga de morbilidad (106).

Cierto nivel de proteinuria es prácticamente universal en los niños con esquistosomiasis, como consecuencia del daño tisular producido por el paso de huevos a través del epitelio vesical y de las cicatrices en la pared producidas por una respuesta inflamatoria sostenida y es una causa de proteinuria con un origen no renal (107, 108). Sin embargo, un nivel de proteinuria mayor a 300 mg/dL implica mayor gravedad y la probable presencia de cierto grado de daño renal (109). En este trabajo el 62% de los niños estudiados presentaban algún grado de proteinuria y en el 19% la proteinuria fue mayor de 300 mg/dL (correspondiente a tres cruces). No es de extrañar que en nuestro estudio el parámetro con mejores valores predictivos positivo y negativo para la presencia de lesiones del tracto urinario superior fue la proteinuria mayor de 300 mg/dL (correspondiente a tres cruces). Además, la proteinuria persistente en la infancia puede provocar alteraciones en el equilibrio hidroelectrolítico y la regulación de fluidos, así como provocar un estado de hipercoagulabilidad y una tendencia a la anemia y a la malnutrición, contribuyendo a las consecuencias tempranas de la esquistosomiasis (110); es decir, que la presencia de proteinuria mayor de 300 mg/dL implica probablemente cierto grado de gravedad por sí misma, aún en la ausencia de lesiones importantes en el estudio ecográfico y justifica la utilización, siempre que sea posible, de tiras reactivas de orina en los estudios epidemiológicos de esquistosomiasis en áreas endémicas (111).

Con respecto a la microhematuria, su presencia prácticamente universal en este grupo de niños (sólo en el 7% de casos no se objetivó presencia de ningún nivel de hematuria) hace que la sensibilidad para la detección de lesiones patológicas en el tracto urinario sea alta pero su especificidad muy baja. Este hallazgo es consistente con otros estudios en áreas endémicas, en los que la detección de microhematuria es buen marcador de la infección por *S. haematobium* pero no de gravedad, por ser un hallazgo relativamente constante (111, 112); de hecho su presencia en tiras reactivas de orina es aceptada como diagnóstico indirecto de esquistosomiasis urinaria en estudios epidemiológicos en zonas de endemia elevada (113). En el caso de la hematuria macroscópica sucede la situación contraria y presenta una buena especificidad pero una baja sensibilidad para la predicción de lesiones en el tracto urinario. La hematuria macroscópica es menos frecuente que la microscópica; aún así, es un hallazgo habitual en áreas endémicas y concretamente en este estudio fue del 19%. La hematuria macroscópica presente o pasada auto referida mediante

cuestionarios es aceptada como método de diagnóstico indirecto de prevalencia de esquistosomiasis en algunos contextos (114). Sin embargo, aunque se han utilizado a gran escala en programas nacionales en varios países (115, 116), principalmente por su rapidez y escaso coste, actualmente están en desuso por grandes diferencias de validez entre grupos: en las niñas tiende a infradiagnosticarse la hematuria, probablemente por confusión con la menstruación en niñas mayores y en niños y niñas no acompañados por adultos a sobrediagnosticarse, posiblemente por interpretar orinas muy concentradas como hemáticas (117, 118).

Como ya se ha comentado, todos los niños recibieron tratamiento con praziquantel 40 mg/kg en dosis única en el momento de la realización de la ecografía. Se realizó educación sanitaria sobre la enfermedad, se les orientó para evitar los baños en agua dulce y fueron citados entre 6 y 8 meses después para la realización de un nuevo análisis de orina y una nueva ecografía urinaria; además, fueron interrogados sobre el cumplimiento con el consejo de evitar bañarse. Procedemos ahora a la discusión de los resultados tras el tratamiento.

Uno de los resultados más llamativos es que todas las alteraciones detectadas mostraron regresión tras el referido periodo de 6-8 meses. Este hallazgo es muy importante, ya que refuerza la idea de los beneficios del tratamiento en áreas de alta endemia. Aunque la mejoría fue mayor en las lesiones vesicales que en las del tracto urinario superior, algunas de las lesiones de mayor gravedad, como dilataciones ureterales e hidronefrosis también revirtieron al cabo de este periodo. Incluso en algunos casos en los que persistía la presencia de hematuria, proteinuria y huevos de *Schistosoma haematobium* en orina también revirtieron las lesiones ecográficas. Un metaanálisis reciente encontró quince estudios realizados en diferentes países de África que analizaban la evolución tras tratamiento de las lesiones ecográficas a nivel del tracto urinario (81). La mayor parte son trabajos en población adulta; cinco de ellos fueron realizados en población en edad escolar en áreas endémicas de Níger, Kenia y Tanzania (5, 80, 90, 91, 119). Comparando nuestros resultados con estos trabajos encontramos que dos estudios realizan seguimiento evolutivo a medio plazo; uno de los estudios, realizado en Níger (91) tenía una tasa de lesiones ecográficas inicial similar a la reportada en esta tesis, del 89% en su caso. En ese trabajo se trató a los niños con praziquantel a dosis de 40 mg/kg y se realizó seguimiento durante tres años; se analizó también la presencia o no de reinfecciones, pero no se realizó nueva

tanda de tratamiento hasta el final del periodo de estudio. Se incluyeron 114 niños en edad escolar de un área muy endémica, independientemente de que el resultado de orina inicial fuese positivo o negativo para *S. haematobium*; inicialmente era positivo en el 75% de los niños; al final del seguimiento de tres años en el 47%. Los autores objetivaron que las lesiones ecográficas disminuyeron de forma rápida tras el tratamiento; sin embargo encontraron diferencias en la dinámica evolutiva entre las alteraciones vesicales y las del tracto superior: mientras que las lesiones vesicales alcanzaron su nivel más bajo en el octavo mes tras el tratamiento, para posteriormente volver a aumentar en número y gravedad, las del tracto urinario superior disminuyeron de forma más lenta pero más constante durante todo el periodo de estudio. Este trabajo aporta datos muy valiosos para conocer la dinámica de las lesiones ecográficas durante un periodo de tiempo prolongado. A pesar de que las lesiones disminuyeron de forma significativa, no llegaron a desaparecer, incluso en el subgrupo en el que no se objetivaron reinfecciones en ese periodo; la misma observación destaca en otro trabajo con un seguimiento de dos años realizado en Tanzania (90), en un área también con una endemia muy elevada, en el que el 77% de los niños estaban infectados por *S. haematobium* al inicio del estudio.

En nuestro estudio, un 68% de los niños experimentaron mejoría o desaparición de sus lesiones ecográficas. Un 10% de los niños que no presentaban ninguna lesión a nivel del tracto urinario en la primera ecografía también tuvieron una ecografía normal en el control, un 15% que sí tenían lesiones patológicas en la ecografía inicial no sufrieron cambios, y en un 7% de los casos las lesiones empeoraron. El motivo por el que algunas de las lesiones no desaparecen completamente no está aclarado y puede deberse a varios factores. En general, principalmente en las lesiones vesicales, se considera que lo más probable es la aparición de nuevas lesiones inflamatorias en relación a reinfecciones (120); sin embargo, no hay estudios que permitan analizar un subgrupo suficientemente claro de pacientes sin reinfecciones, debido a la alta carga de enfermedad en las zonas en las que se han realizado los trabajos, y a que éstos son francamente escasos; existe además una consistencia en los resultados de todos los estudios a pesar de las diferencias en el tiempo de seguimiento, es decir, incluso en los trabajos con tiempo de seguimiento corto, en el que es menos probable que las posibles lesiones producidas por reinfecciones lleguen a los niveles de gravedad anteriores, la desaparición de estas no es completa. Otras posibilidades de que las

lesiones persistan o empeoren a pesar del tratamiento puede ser la cronicidad de las mismas, con estadios del proceso inflamatorio más avanzados, con tractos fibrosos o cicatrices ya establecidos, la presencia de sobreinfecciones bacterianas que mantengan el proceso inflamatorio a pesar de la disminución de la carga parasitaria, o bien que una única dosis de praziquantel no sea suficiente para curar la infección en contextos de muy alta intensidad de la infección (81, 91). Esta última explicación es bastante plausible; teniendo en cuenta además que el praziquantel es eficaz únicamente contra las formas adultas, es claro que la presencia de huevos a nivel del sistema genito-urinario no desaparece completamente tras una dosis única de tratamiento (121). Se han sugerido también factores inmunitarios individuales que podrían justificar que algunas personas desarrollen lesiones más severas que otras ante mismos niveles de intensidad de la infección, o que estos mismos factores individuales condicionen diferentes intensidades de infección ante niveles de exposición similares (122, 123); en el estudio de Hatz y colaboradores desarrollado en Tanzania (90) aquellos niños con lesiones iniciales más graves eran los más susceptibles a desarrollar lesiones más rápidamente tras la reinfección. En este sentido, se ha sugerido que las personas no respondedoras a los antígenos solubles de huevos de *Schistosoma spp*, es decir, sin producción de anticuerpos frente a este antígeno, presentan en general lesiones más avanzadas que aquellos con una respuesta más potente, y que aquellas personas con un perfil policlonal, con una respuesta mixta Th1-Th2 a un número elevado de antígenos de *Schistosoma spp* evolucionan menos hacia lesiones de gravedad (124); en todo caso la generalización en este tema es difícil, ya que la respuesta inmunitaria hacia este parásito es extremadamente compleja y variable, tanto de manera interpersonal como en el mismo individuo a lo largo del tiempo y en función de los tratamientos y re-tratamientos (125, 126).

Otro dato llamativo en nuestro estudio fue que la regresión de todos los parámetros evaluados en el estudio ecográfico fue mayor en los niños mayores de 10 años que en los menores. Este hallazgo es sorprendente, ya que la edad es considerada habitualmente como un marcador de exposición acumulada al parásito, y por tanto de mayor daño tisular, y además generalmente las lesiones con mayor tiempo de evolución tienden a presentar mayor contenido de tejido fibroso (127). Una posible explicación para esta observación podría ser que los niños mayores fuesen más receptivos al consejo de evitar baños en el río, y por tanto, aunque los niveles de reinfección entre ambos grupos no mostraron diferencias, sí que podría haber una

diferencia no detectada en la intensidad de la infección. Otra razón podría ser que en el área en la que se realizó este estudio los niños más pequeños presentan una tasa de comorbilidades como anemia y malnutrición muy elevada, en general mayor a la de los adultos y a la de los niños más mayores que ya han superado esa etapa; dado que el praziquantel requiere un sistema inmune competente para alcanzar su máxima eficacia, cabe la posibilidad de que su eficacia fuese menor en estos niños. Por otra parte, las tabletas de praziquantel se presentan en dosis de 600 mg y no es fácil de conseguir el ajuste óptimo de dosis en niños que pesan menos de 15 kilogramos.

Todo ello nos hace concluir que la dinámica de las lesiones secundarias a esquistosomiasis urinaria no es conocida con exactitud, y que son necesarios más estudios que arrojen luz sobre este tema, ya que su importancia es crucial para poder diseñar estrategias de control más coste-efectivas y basadas en la evidencia que las actuales. Además, tal y como se comentó anteriormente, ningún tipo de lesión debería considerarse como de “escasa gravedad”, ya que independientemente de su alteración funcional o posible evolución futura, corresponden en cualquier caso a un estado de inflamación crónica con las consecuencias mencionadas sobre el desarrollo.

Tras el periodo de seguimiento de 6-8 meses, el 25,7% de los niños continuaban presentando huevos de *S. haematobium* en orina. Un cierto nivel de emisión de huevos tras el una dosis de tratamiento es lo habitual en áreas endémicas; de hecho, las guías más recientes de la OMS sobre la medición de la eficacia del praziquantel recomiendan la utilización de la tasa de reducción de huevos (ERR) por encima de la tasa de curación completa (128). Esta tasa se calcula dividiendo la media aritmética de huevos en el control posterior al seguimiento entre la media aritmética de huevos tras el tratamiento y multiplicando por 100; en el caso del praziquantel se considera satisfactoria si es mayor o igual al 90%. Esto quiere decir que, en el caso de la esquistosomiasis urinaria, tras una dosis de tratamiento, es esperable que el número de huevos emitido por una persona se haya reducido al 10% del que emitía previamente. En este caso no disponemos del dato de la intensidad de la infección (número de huevos por 10 ml de orina), por lo que es posible que, al tratarse de un área con una endemia muy elevada, este porcentaje de pacientes con emisión de huevos al final del seguimiento sea el esperado. Otras posibilidades son las reinfecciones, la presencia de formas inmaduras en el momento del tratamiento o la ineficacia de una sola dosis de

praziquantel 40 mg/kg en un contexto de tan alta carga parasitaria y en niños con probables coinfecciones con otros helmintos (129, 130).

Tanto la hematuria macroscópica como la hematuria microscópica y la proteinuria disminuyeron de forma muy significativa tras el tratamiento; la menor tasa de reducción correspondió a la proteinuria; ya que como se ha comentado, la proteinuria es un marcador de gravedad (106), es lógico que su mejoría presente una disminución más lenta. Este hallazgo es consistente con lo reportado en otros estudios realizados en áreas endémicas (107, 110, 131).

Tanto los dos trabajos que componen esta tesis como el estudio epidemiológico previo incluido en el anexo se realizaron en el municipio de Cubal, Angola. En esta zona, no sólo la epidemiología de la esquistosomiasis era previamente desconocida, si no que el conocimiento del personal sanitario y educativo y de la población general sobre la transmisión de la infección, posibles medidas preventivas, historia natural e importancia de la enfermedad era prácticamente nulo. Desde el inicio de la actividad investigadora en la zona, se han realizado actividades educativas a todos los niveles; previamente al estudio epidemiológico se realizaron talleres con profesores, directores de escuela y tutores de los alumnos para informar de las actividades que se iban a realizar y de su importancia. El compromiso de la comunidad es fundamental para el buen desarrollo de los trabajos que componen esta tesis y en general para el éxito de cualquier programa de salud que se pretenda implementar en la zona. Esta idea ha tomado forma en los últimos años a muchos niveles y en algunos programas de salud de varios países africanos las intervenciones dirigidas por la comunidad, es decir, organizadas por los propios agentes comunitarios, forman parte de las estrategias de control de varias enfermedades, incluyendo la esquistosomiasis (132-134). Esta alternativa se postula estratégica en el nuevo paradigma planteado para el control de la esquistosomiasis. Cada vez parece más evidente que los tratamientos de administración masiva de praziquantel no deben restringirse a las escuelas, si no que deben ampliarse a toda la comunidad, además de ser acompañadas de otras estrategias, principalmente por dos motivos; con el tratamiento realizado únicamente a los niños que acuden a las escuelas, se pierde el posible efecto sobre la disminución de la prevalencia de la esquistosomiasis en la comunidad, ya que permanece una bolsa de población que incluye a los niños menores de cinco años, niños no escolarizados por cualquier motivo y personas adultas, que continúan excretando huevos en gran

cantidad y por tanto perpetuando la transmisión. Estas poblaciones excluidas de los tratamientos periódicos son suficientes para mantener el ciclo de la esquistosomiasis en niveles elevados, ya que el factor limitante para la transmisión es, en mucha mayor medida que el hospedador humano, el hospedador intermedio, es decir, las especies de caracol presentes en la zona (135); esta realidad ha sido descrita en varios países en los que las medidas de control basadas principalmente en administración masiva de medicamentos en las escuelas consiguen disminuir la prevalencia de forma temporal en el grupo de población en que se administran pero su influencia es menor en la comunidad y además no sostenida en el tiempo (136-140). Por otra parte, el conocimiento cada vez mayor de todas las consecuencias de la esquistosomiasis, así como de la eficacia y sencillez del tratamiento, presiona a las estructuras de salud al compromiso de tratar a todas las personas afectadas, independientemente de su edad. Los esfuerzos y costes que supondrá implantar estas nuevas estrategias de control, que además de ampliar el foco de los tratamientos masivos, deben incluir otras medidas, tanto educativas como sanitarias y ambientales, implican necesariamente al tejido comunitario (141, 142).

Concretamente, en los trabajos que conforman esta tesis, se realizó educación sanitaria tanto con los niños estudiados como con sus familiares, explicando el ciclo de vida del parásito, las formas de transmisión, las posibles medidas preventivas y la importancia de la enfermedad y de su tratamiento. En el segundo trabajo se preguntó a los niños y familiares el cumplimiento con el consejo de evitar bañarse en el río; el 69% de los niños aseguraron haber seguido esta recomendación durante el tiempo de estudio. A pesar de que es posible que pudiese existir un sesgo en esta respuesta debido a un reconocimiento positivo por parte de los examinadores, se encontró un menor grado de morbilidad en el control en este grupo, tanto en los niveles de hematuria micro y macroscópica y proteinuria como en las lesiones a nivel ecográfico, aunque estas diferencias no fueron significativas. Este hallazgo refuerza la idea de la importancia de reforzar las medidas educativas en la zona como parte del control de la esquistosomiasis.

8. LIMITACIONES

Una limitación de los trabajos que componen esta tesis es el elevado número de pérdidas durante todo el periodo de estudio. De todos los pacientes diagnosticados de esquistosomiasis urinaria durante el estudio epidemiológico inicial se citaron para la realización de ecografía urinaria 627 niños, de los cuales se presentaron 157; de ellos, 70 acudieron para el control posterior entre seis y ocho meses después. Los motivos por los cuales un número tan elevado de niños no realizaron el seguimiento completo son diversos. En primer lugar, como se ha comentado, estos estudios corresponden a trabajos muy iniciales de la epidemiología de la esquistosomiasis en la zona, por lo que la percepción de gravedad en relación a esta enfermedad es aún muy baja; a ello contribuyen su propia evolución natural, que dificulta relacionar los episodios de hematuria prácticamente generalizados durante la infancia con los casos de cáncer vesical de aparición en la mediana edad, así como la naturaleza focal de la distribución de la esquistosomiasis, que provoca una infección tan generalizada a nivel local, que hace complicado discriminar los síntomas atribuibles a la misma. Además, para la realización de las ecografías era necesario que los niños se trasladasen al hospital acompañados de un adulto responsable; en algunos casos, dada la situación de escasos recursos de la zona donde se realizaron los trabajos, esto podía suponer un esfuerzo elevado. Para intentar objetivar si esta limitación podría haber originado un sesgo importante en los resultados del estudio, se compararon las características de los niños que continuaron todo el proceso hasta el final del estudio con las de aquellos que no completaron todos los pasos, observándose que las únicas diferencias significativas fueron que los niños que no completaron eran ligeramente más jóvenes y tenían un nivel mayor de hematuria microscópica, por lo que pensamos que estas diferencias no originan un sesgo, y que en todo caso han supuesto una reducción en la potencia del estudio.

Otra limitación importante es la ausencia de datos sobre la intensidad de la infección. En general se recomienda para el diagnóstico a nivel poblacional de la infección por *S. haematobium* la filtración de la orina a través de filtros con microporos, para cuantificar el número de huevos por 10 ml de orina y este dato se denomina intensidad de la infección. En nuestro caso no se realizó esta técnica por las propias características de los trabajos; hay que tener en cuenta que fueron realizados sin

financiación externa y en un contexto de muy escasos recursos; esta determinación no fue posible por restricciones tanto técnicas como económicas. Además, no se realizó estudio urinario a los pocos días tras el tratamiento, por lo que no puede afirmarse con certeza que la tasa de pacientes con excreción de huevos de *S. haematobium* en el control sean reinfecciones. Creemos que, aunque esta información habría sido valiosa, los resultados obtenidos únicamente con los datos de prevalencia son válidos y permiten conseguir los objetivos planteados.

Por otra parte, el tiempo de seguimiento fue corto, entre 6 y 8 meses entre la primera y la segunda ecografía. Aunque este hecho no puede considerarse una limitación en sí mismo, ya que aporta datos muy valiosos sobre la evolución a corto plazo, un seguimiento posterior más prolongado mejoraría el conocimiento de la dinámica en varios momentos. Las restricciones previamente planteadas condicionaron también este aspecto.

9. CONCLUSIONES

1. La carga de morbilidad en pacientes en edad escolar secundaria a esquistosomiasis urinaria en el municipio de Cubal, Angola, es de las más elevadas descritas en zonas endémicas.
2. La tira reactiva urinaria es útil para la predicción de lesiones patológicas en el tracto urinario en esta población. La proteinuria mayor de 300 mg/dL constituye por sí misma un dato de gravedad y es el mejor predictor de lesiones en el tracto urinario superior, con un valor predictivo positivo para la detección de lesiones a cualquier nivel superior al 90% y para las lesiones del tracto urinario superior del 65%.
3. Tras un periodo de 6-8 meses, las lesiones del tracto urinario tanto inferior como superior mejoraron de forma muy significativa, pero no desaparecieron completamente; en un 20% de casos no mejoraron o empeoraron. Tampoco desaparecieron por completo ninguno de los otros parámetros asociados a la infección por *Schistosoma haematobium*; el parámetro con una menor reducción fue la proteinuria, que persistió en el 30% de los casos.

10. LÍNEAS DE TRABAJO FUTURAS

En conjunto, los dos trabajos que conforman esta tesis, junto con el estudio inicial incluido en el anexo, conforman un mapa de la situación epidemiológica de la esquistosomiasis en el municipio de Cubal, Angola. Esta información es fundamental tanto para los clínicos e investigadores que trabajan en el terreno como para los responsables de salud pública. La constatación de que esta área representa una de las regiones con mayor carga de enfermedad secundaria a esquistosomiasis urinaria descritas hasta la fecha abre el campo para multitud de intervenciones.

Lógicamente, con esta situación de alta endemia de esquistosomiasis urinaria, el control de la morbilidad es una prioridad absoluta en la zona. En este sentido, los resultados de estos trabajos fueron publicados no sólo en revistas científicas de impacto, si no comunicados a las autoridades sanitarias locales; gracias a ello, el municipio de Cubal ha sido incluido en el plan nacional de Angola para el control de esquistosomiasis y en 2017 comenzó por primera vez la distribución masiva de praziquantel en la zona. Aunque se trata de una primera medida y mucho trabajo queda aún por hacer, el impacto de comenzar actividades preventivas en el municipio es enorme.

Como se comentó anteriormente, las medidas educativas, que son un punto fundamental en el control de la infección, se han venido realizando desde el inicio de la actividad del equipo investigador en Cubal; estudios sobre el impacto de nuevas metodologías de aprendizaje en las escuelas serán realizados próximamente, con el fin de implantar aquellas actividades que demuestren una mayor reducción sobre la transmisión.

Estudios ambientales en relación al hospedador intermedio permitirán detallar la dinámica de la transmisión y abrir la puerta en un futuro a medidas de control ambientales. En este sentido, se planean estudios sobre cuáles son las especies de caracol presentes en la zona y su distribución actual. Otros estudios ambientales a realizar incluyen la determinación de la posible presencia de especies híbridas en la zona, y el posible papel del ganado en la transmisión de la infección en la zona.

A nivel clínico el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad y la posibilidad

de diagnosticar la morbilidad de forma directa mediante estudio ecográfico y de forma indirecta mediante la realización de tiras reactivas de orina permitirá aumentar el número de diagnósticos y tratamientos realizados. Además, se plantea la realización de protocolos que orienten sobre los tratamientos y controles a realizar en función del nivel de morbilidad individual en cada paciente basados en estos resultados.

La constatación del alto grado de enfermedad en niños con una media de edad tan baja plantea la pregunta de la edad a la que comienzan las lesiones en esta zona, y hasta qué punto estas lesiones condicionan el desarrollo en la primera infancia, y cuál es su influencia en otras enfermedades muy prevalentes en la zona. Estudios dirigidos a niños en edad pre-escolar que permitieran conocer datos tanto clínicos como inmunológicos en este grupo permitirían profundizar en la importancia de la esquistosomiasis sobre el desarrollo en las primeras etapas de la vida.

Por otra parte, como se ha mostrado, se necesitan estudios ecográficos más prolongados que aporten mayor exactitud a la dinámica clínica de la esquistosomiasis urinaria en la zona. Estudios combinados con diferentes pautas de tratamiento permitirían establecer los tiempos adecuados para evitar la aparición de lesiones patológicas; análisis de coste-eficacia de diferentes estrategias ayudarían a optimizar las estrategias de administración masiva de medicamentos en función de las necesidades locales.

Otras áreas de estudio que se abren en la zona a raíz de estos trabajos pueden incluir estudio de farmacocinética de praziquantel en diferentes edades y en pacientes con otras comorbilidades, trabajos en relación a la patología genital o detección de marcadores de lesiones cancerosas en estadíos iniciales.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO fact sheet on schistosomiasis. www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis.
2. Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop* 2000; 77: 41-51.
3. Van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S, Looman CW, Nagelkerke NJ, Habbema JD, et al. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop* 2003; 86: 125-139.
4. Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *Lancet*. 2014 June 28; 383 (9936): 2253-2264.
5. Tohon ZB, Mainassara HB, Garaba A, Mahamane AE, Bosqué-Oliva E, Ibrahim ML, et al. Controlling schistosomiasis: significant decrease of anaemia prevalence one year after a single dose of praziquantel in Nigerian schoolchildren. *PLOS Negl Trop Dis* 2008; 2: e 241.
6. King CH, Dangerfield-Cha M. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. *Chronic Illn*. 2008; 4:65-79.
7. Friedman JF, Kanzaria HK, Acosta LP, Langdon GC, Manalo DL, Wu H, et al. Relationship between *Schistosoma japonicum* and nutritional status among children and Young adults in Leyte, the Philippines. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; 72:527-33.
8. Ezeamama AE, Friedman JF, Acosta LP, Bellinger DC, Langdon GC, Manalo DL, et al. Helminth infection and cognitive impairment among Filipino children. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; 72: 540-48.
9. Bustinduy AL, Thomas CL, Fiutem JJ, Parraga IM, Mungai PL, Muchiri EM, et al. Measuring fitness of Kenyan children with polyparasitic infections using the 20-meter shuttle run test as a morbidity metric. *Plos Negl Trop Dis*. 2011; 5: e1213.
10. Friedman JF, Kanzaria HK, McGarvey ST. Human schistosomiasis and anemia: the relationship and potential mechanisms. *Trends Parasitol*. 2005; 21: 386-92.
11. Mupfasoni D, Karibushi B, Koukounari A, Ruberanziza E, Kaberuka T, Kramer MH, et al. Polyparasite helminth infections and their association to anaemia and undernutrition in Northern Rwanda. *Plos Negl Trop Dis*. 2009; 3: e517.

12. Freer JB, Bourke CD, Durhuus GH, Kjetland EF, Prendergast AJ. Schistosomiasis in the first 1000 days. *Lancet Infect Dis*. 2018 Jun; 18 (6): e193-e2013.
13. GBD 2016 Disease and Injury incidence and prevalence collaborators. Global, regional and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017; 390: 1211-1259.
14. Central Intelligence Agency. Angola. *The World Factbook*. Washington, DC: Central Intelligence Agency.
15. MINSA, WFP, WHO, UNICEF (2005). Baseline survey for helminth control in school-aged children in Angola. Luanda: Ministerio de Saúde.
16. Sousa-Figueiredo JC, Gamboa D, Pedro JM, Fancony C, Langa AJ, Magalhães RJ, et al. Epidemiology of malaria, schistosomiasis, geohelminths, anemia and malnutrition in the context of a demographic surveillance system in northern Angola. *PLoS ONE* 2012; 7:e33189.
17. Grácio MA. Contribution to the knowledge and incidence of bladder bilharziasis in the district of Benguela. III. Municipality of Cubal. *An Inst Hig Med Trop (Lisb)*. 1977-1978; 5 (1-4):289-92.
18. Bocanegra C, Gallego S, Mendioroz J, Moreno M, Sulleiro E, Salvador F, et al. Epidemiology of schistosomiasis and usefulness of indirect diagnostic tests in school-age children in Cubal, Central Angola. *Plos Negl Trop Dis* 2015; 9 (10): e0004055.
19. Lawson JR, Wilson RA. The survival of the cercariae of *Schistosoma mansoni* in relation to water temperature and glycogen utilization. *Parasitology* 1980; 81: 337-48.
20. Rollinson, D, Simpson AJG (1987). *The Biology of Schistosomes. From Genes to Latrines*. Academic Press, London.
21. Woolhouse MEJ, Chandiwana SK, Bradley M (1990). On the distribution of schistosome infections among host snails. *International Journal for Parasitology* 20, 325–327.
22. Burke ML, Jones MK, Gobert GN, Li YS, Ellis MK, McManus DP. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol*. 2009; 31:163-76.
23. Pearce EJ, MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2: 499-511.

24. Fairfax K, Nascimento M, Huang SC, Everts B, Pearce EJ. Th2 responses in schistosomiasis. *Semin Immunopathol.* 2012; 34:863-71.
25. Ross AG, Vickers D, Olds GR, Shah SM, McManus DP. Katayama syndrome. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7:218-24.
26. Eloi-Santos SM, Novato-Silva E, Maselli VM, Gazzinelli G, Colley DG, Correa-Oliveira R. Idiopathic sensitization in utero of children born to mothers with schistosomiasis or Chagas' disease. *J Clin Invest.* 1989; 84:1028-31.
27. King CL, Malhotra I, Mungai P, Wamachi A, Kioko J, Ouma JH, et al. B cell sensitization to helminthic infection develops in utero in humans. *J Immunol.* 1998; 160:3578-84.
28. Taylor P, Chandiwana SK, Matanhire D. Evaluation of the reagent strip test for haematuria in the control of *Schistosoma haematobium* infection in schoolchildren. *Acta Trop* 1990 Feb; 47(2):91-100.
29. King CH, Keating CE, Muruka JF, Ouma JH, Houser H, Siongok TK, et al. Urinary tract morbidity in schistosomiasis haematobia: associations with age and intensity of infection in an endemic area of Coast Province, Kenya. *Am J Trop Med Hyg.* 1988; 39:361-68.
30. Wamachi AN, Mayadev JS, Mungai PL, Magak PL, Ouma JH, Magambo JK, et al. Increased ratio of tumor necrosis factor-alpha to interleukin-10 production is associated with *Schistosoma haematobium*-induced urinary-tract morbidity. *J Infect Dis.* 2004; 190:2020-30.
31. Khalaf I, Shokeir A, Shalaby M. Urologic complications of genitourinary schistosomiasis. *World J Urol.* 2012; 30:31-38.
32. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 2012; 100:1-441.
33. WHO Organization: Evaluation of carcinogenic risk to humans. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr. 61: 45-119. IARC Monogr. 1994;61.
34. Fu CL, Odegaard JJ, Herbert DR, Hsieh MH. A Novel Mouse Model of *Schistosoma haematobium* Egg-Induced Immunopathology. *PLoS Pathog.* 2012; 8:e1002605.

35. Rinaldi G, Okatcha TI, Popratiloff A, Ayuk MA, Suttiaprapa S, Mann VH, et al. Genetic Manipulation of *Schistosoma haematobium* the Neglected Schistosome. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5:e1348.
36. Young ND, Jex AR, Li B, Lui S, Yang L, Xiong Z, et al. Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium* . Nat. Genet. 2012; 44:221–225.
37. Adeyeba OA, Ojeaga SGT. Urinary schistosomiasis and concomitant urinary tract pathogens among school children in metropolitan Ibadan. Afr J Biomed Res. 2002; 5:103–108.
38. Stelekati E, Wherry EJ. Chronic bystander infections and immunity to unrelated antigens. Cell Host Microbe. 2012; 12:458–469.
39. Ma N, Thanan R, Kobayashi H, Hammam O, Wishahi M, El Leithy T, et al. Nitritative DNA damage and Oct3/4 expression in urinary bladder cancer with *Schistosoma haematobium* infection. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011; 414:344–349.
40. Vennervald BJ, Polman K. Helminths and malignancy. Parasite Immunol. 2009; 31:686–696.
41. Bedwani R, el-Khwsy F, Renganathan E, Braga C, Abu Seif HH, Abul Azm T, et al. Epidemiology of bladder cancer in Alexandria, Egypt: Tobacco smoking. IntJCancer. 1997; 73:64–67.
42. Mostafa MH, Sheweita SA, O'Connor PJ. Relationship between Schistosomiasis and Bladder Cancer. Clin. Microbiol. Rev. 1999; 12:97–111.
43. Jourdan PM, Randrianasolo BS, Feldmeier H, Chitsulo L, Ravoniarimbina P, Roald B, et al. Pathologic mucosal blood vessels inactive female genital schistosomiasis: new aspects of a neglected tropical disease. Int J Gynecol Pathol. 2013; 32:137-40.
44. Kjetland EF, Leutscher PD, Ndhlovu PD. A review of female genital schistosomiasis. Trends Parasitol. 2012; 28:58-65.
45. Kjetland EF, Ndhlovu PD, Gomo E, Mduluza T, Midzi N, Gwanzura L, et al. Association between genital schistosomiasis and HIV in rural Zimbabwean women. AIDS.2006; 20:593-600.
46. Leutscher P, Ramarokoto CE, Reimert C, Feldmeier H, Esterre P, Vennervald BJ. Community-based study of genital schistosomiasis in men from Madagascar. Lancet. 2000; 355: 117-18.

47. Ndamba J, Makaza N, Munjoma M, Gomo E, Kaondera KC. The physical fitness and work performance of agricultural workers infected with *Schistosoma mansoni* in Zimbabwe. *Ann Trop Med Parasitol*. 1993; 87:553-61.
48. Jukes MC, Nokes CA, Alcock KJ, Lambo JK, Khamia C, Ngorosho N, et al. Partnership for child development. Heavy schistosomiasis associated with poor short-term memory and slower reaction times in Tanzanian schoolchildren. *Trop Med Int Health*. 2002; 7:104-17.
49. Sturrock, RF, Kariuki HC, Thiongo FW, Gachare JW, Omondi BG, Ouma JH, et al. (1996) Schistosomiasis mansoni in Kenya: relationship between infection and anaemia in schoolchildren at the community level. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90, 48–54
50. Gurarie D, Wang X, Bustinduy AL, King CH. Modeling the effect of chronic schistosomiasis on childhood development and the potential for catch-up growth with different drug treatment strategies promoted for control of endemic schistosomiasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 84:773-81.
51. Coutinho HM, Acosta LP, McGarvey ST, Jarilla B, Jiz M, Pablo A, et al. Nutritional status improves after treatment of *Schistosoma japonicum*-infected children and adolescents. *J Nutr* 2006; 136:183-88.
52. Ndeffo Mbah ML, Skrip L, Greenhalgh S, Hotez P, Galvani AP. Impact of *Schistosoma mansoni* on malaria transmission in Sub-Saharan Africa. *Plos Negl Trop Dis*. 2014 Oct 16; 8(10): e3234.
53. Degarege A, Degarege D, Veledar E, Erko B, Nacher M, Beck-Sague CM, et al. *Plasmodium falciparum* infection status among children with *Schistosoma* in Sub-Saharan Africa: A systematic review and metanalysis. *Plos Negl Trop Dis*. 2016 Dec 7; 10(12): e0005193.
54. Sokhna C, Le Hesran JY, Mbaye PA, Akiana J, Camara P, Diop M, et al. Increase of malaria attacks among children presenting concomitant infection by *Schistosoma mansoni* in Senegal. *Malar J*.2004; 3:43.
55. Briand V, Watier L, Le Hesran JY, García A, Cot M. Coinfection with *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma haematobium*: protective effect of schistosomiasis on malaria in Senegalese children?. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72:702-07.
56. Ross AG, McManus DP, Farrar J, Hunstman RJ, Gray DJ, Li YS. Neuroschistosomiasis. *J Neurol* 2012; 259:22-32.

57. WHO. The control of schistosomiasis: second report of the WHO Expert Committee. World Health Organization; Geneva: 1991.
58. Gray DJ, Ross AG, Li YS, McManus DP. Diagnosis and management of schistosomiasis. *BMJ* 2011;342: d2651.
59. Utzinger, S.L. Becker, L. van Lieshout, G.J. van Dam, S. Knopp. New diagnostic tools in schistosomiasis. *Clin Microbiol Infect* 2015: 21: 529-542
60. Ochodo EA, Gopalakrishna G, Spek B, Reitsma JB, van Lieshout L, Polman K, et al. Circulating antigen tests and urine reagent strips for diagnosis of active schistosomiasis in endemic areas. *Cochrane Database Syst Rev* 2015: 11:CD009579.
61. Knopp S, Corstjens PL, Koukounari A, Cercamondi CI, Ame SM, Ali SM, et al. Sensitivity and specificity of a urine circulating anodic antigen test for the diagnosis of *Schistosoma haematobium* in low endemic settings. *PLoS Negl Trop Dis* 2015: 9: e0003752.
62. Vinkeles Melchers NV, van Dam GJ, Shaproski D, Kahama AI, Brienen EA, et al. Diagnostic performance of *Schistosoma* Real-Time PCR in urine samples from Kenyan children infected with *Schistosoma haematobium*: Day-to-day variation and follow-up after praziquantel treatment. *PLoS Negl Trop Dis* 2014: 8: e2807
63. Ibranke O, Koukounari A, Asaolu S, Moustaki I, Shiff C. Validation of a new test for *Schistosoma haematobium* based on detection of Dra1 DNA fragments in urine: evaluation through latent class analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2012: 6: e1464.
64. Gandasegui J, Fernández-Soto P, Dacal E, Rodríguez E, Saugar JM, Yepes E, et al. Field and laboratory comparative evaluation of a LAMP assay for the diagnosis of urogenital schistosomiasis in Cubal, Central Angola. *Trop Med Int Health* 2018 Jun 19.
65. Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2008; 21:659-67.
66. Brindley PJ, Sher A. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *J Immunol.* 1987; 139:215-20.
67. Sousa-Figueiredo JC, Betson M, Atuhaire A, Arinaitwe M, Navaratnam AM, Kabatereine NB, et al. Performance and safety of praziquantel for treatment of intestinal schistosomiasis in infants and preschool children. *Plos Negl Trop Dis.* 2012; 6:e1864.

68. Stothard JR, Sousa-Figueiredo JC, Betson M, Bustinduy A, Reinhard-Rupp J. Schistosomiasis in African infants and preschool children: let them now be treated. *Trends Parasitol.* 2013; 29:197-205.
69. Zanolla D, Perissutti B, Passerini N, Chierotti MR, Hasa D, Voinovich D, et al. A new soluble and bioactive polymorph of praziquantel. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018 Jun; 127:19-28.
70. Doenhoff MJ, Kusel JR, Coles GC, Cioli D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96: 465-69.
71. King CH, Olbrych SK, Soon M, Singer ME, Carter J, Colley DG. Utility of repeated praziquantel dosing in the treatment of schistosomiasis in high-risk communities in Africa: a systematic review. *Plos Negl Trop Dis.* 2011; 5:e1321.
72. Danso-Appiah A, De Vlas SJ. Interpreting low praziquantel cure rates of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal. *Trends Parasitol.* 2002; 18:125-9.
73. Saeed MEM, Krishna S, Greten HJ, Kreamsner PG, Efferth T. Antischistosomal activity of artemisinin derivatives in vivo and in patients. *Pharmacol Res.* 2016 Aug; 110:216-226.
74. Utzinger J, N'Goran EK, N'Dri A, Lengeler C, Xiao S, Tanner M. Oral artemether for prevention of *Schistosoma mansoni* infection: randomised controlled trial. *Lancet.* 2000; 355:1320-25.
75. Pérez del Villar L, Burguillo FJ, López-Abán J, Muro A. Systematic review and meta-analysis of artemisinin based therapies for the treatment and prevention of schistosomiasis. *Plos One.* 2012; 7:e45867.
76. Katz N, Rocha RS, de Souza CP, Coura Filho P, Bruce JI, Coles GC, et al. Efficacy of alternating therapy with oxamniquinina and praziquantel to treat *Schistosoma mansoni* in children following failure of first treatment. *Am J Trop Med Hyg.* 1991; 44:509-12.
77. King CH. Toward the elimination of schistosomiasis. *N Engl J Med.* 2009; 360(2):106-109.
78. WHO. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: report of a WHO expert committee. Technical Report Series 912. Geneva: World Health Organization, 2002 912.
79. Brouwer KC, Ndhlovu PD, Wagatsuma Y, Munatsi A, Shiff CJ. 332 Epidemiological assessment of *Schistosoma haematobium*-induced kidney and

bladder pathology in rural Zimbabwe. *Acta Trop*. 2003; 85 (3):339–347.

80. Kahama AI, Vennervald BJ, Kombe Y, Kihara RW, Ndzovu M, Mungai P, et al. Parameters associated with *Schistosoma haematobium* infection before and after chemotherapy in school children from two villages in the coast province of Kenya. *Trop Med Int Health*. 1999; 4(5):335–340.

81. Andrade G, Bertsch DJ, Gazzinelli A, King CH. Decline in infection-related morbidities following drug-mediated reductions in the intensity of *Schistosoma* infection: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(2).

82. Shen Y, King CH, Binder S, Zhang F, Whalen CC, Evan Secor W, et al. Protocol and baseline data for a multi-year cohort study of the effects of different mass drug treatment approaches on functional morbidities from schistosomiasis in four African countries. *BMC Infectious Diseases* (2017) 17:652.

83. Hatz CF. The use of ultrasound in schistosomiasis. *Adv Parasitol* 2001; 48: 225–284.

84. Richter J, Hatz C, Campagne G, Bergquist N, Jenkins J. *Ultrasound in Schistosomiasis: A Practical Guide to the Standardized Use of Ultrasonography for the Assessment of Schistosomiasis-Related Morbidity*. World Health Organization: Geneva, 2000.

85. Akpata R, Neumayr A, Holtfreter MC, et al. The WHO ultrasonography protocol for assessing morbidity due to *Schistosoma haematobium*. Acceptance and evolution over 14 years. Systematic review. *Parasitol Res*. 2015 Apr; 114(4):1279-89.

86. WHO. 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. WHO, Geneva, Switzerland. whqlibdoc.who.int.

87. Koukounari A, Sacko M, Keita AD, Gabrielli AF, Landouré A, Dembelé A, et al. Assessment of ultrasound morbidity indicators of schistosomiasis in the context of large-scale programs illustrated with experiences from Malian children. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75: 1042–1052.

88. Ekwunife CA, Okafor FC, Nwaorgu OC. Ultrasonographic screening of urinary schistosomiasis infected patients in Agulu community, Anambra state, Southeast Nigeria. *Int Arch Med* 2009; 2: 34.

89. Serieye J, Boisier P, Ravaoalimalala VE, Ramarokoto CE, Leutscher P, Esterre P, et al. *Schistosoma haematobium* infection in western Madagascar: morbidity determined by ultrasonography. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90: 398–401.

90. Hatz CF, Vennervald BJ, Nkulila T, Vounatsou P, Kombe Y, Mayombana C, et al. Evolution of *Schistosoma haematobium*-related pathology over 24 months after

treatment with praziquantel among school children in southeastern Tanzania. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 775–781.

91. Campagne G, Garba A, Barkir_e H, Vera C, Sidiki A, Chippaux JP. Continued ultrasonic follow-up of children infected with *Schistosoma haematobium* after treatment with praziquantel. *Trop Med Int Health* 2001; 6: 24–30.

92. Elmadani AE, Hamdoun AO, Monis A, Karamino NE, Gasmelseed N. Ultrasound findings in urinary schistosomiasis infection in school children in the Gezira State Central Sudan. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2013; 24: 162–167.

93. Van der Werf MJ, de Vlas SJ. Diagnosis of urinary schistosomiasis: a novel approach to compare bladder pathology measured by ultrasound and three methods for hematuria detection. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71: 98–106.

94. Michaud DS. Chronic inflammation and bladder cancer. *Urol Oncol* 2007;25:260–8.

95. Felix AS, Soliman AS, Khaled H, Zaghloul MS. Changing patterns of bladder cancer in Egypt over the past 26 years. *Cancer Causes Control* 2008;19:421–9.

96. Naples J, Isharwal S, Shiff CJ, Bosompem KM, Veltri RW. Clinical utility of squamous and transitional nuclear structure alterations induced by *Schistosoma haematobium* in chronically infected adults with bladder damage verified by ultrasound in Ghana. *Anal Quant Cytol Histol* 2009;31:143–52.

97. Ramos D, Ruiz A, Morell A, Navarro S, Villamon R. Prognostic value of morphometry in low grade papillary urothelial bladder neoplasms. *Anal Quant Cytol Histol* 2008;26:285–94.

98. Eissa S, Zohny SF, Swellam M, Mahmoud MH, El-Zayat TM, Salem AM. Comparison of CD44 and cytokeratin 20 mRNA in voided urine samples as diagnostic tools for bladder cancer. *Clin Biochem* 2008;41:1335–41.

99. Eissa S, Kassim SK, Labib RA, El Khouly IM, Ghaffer TM, Sadek M, et al. Detection of bladder carcinoma by combined testing of urine for hyaluronidase and cytokeratin 20 RNAs. *Cancer* 2005;103:1356–62.

100. Shiff C, Naples JM, Isharwal, Bosompem KM, Veltri RW. Non-invasive methods to detect schistosome-based bladder cancer: is the association sufficient for epidemiological use?. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010 Jan; 104 (1):3-5.

101. King CH, Muchiri EM, Mungai P, Ouma JH, Kadzo H, Magak P, et al. Randomized comparison of low-dose versus standard-dose praziquantel therapy in treatment of urinary tract morbidity due to *Schistosoma haematobium* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66(6):725–30.

102. Devidas A, Lamothe F, Develoux M, Mouchet F, Sellin B. Ultrasonographic assessment of the regression of bladder and renal lesions due to *Schistosoma haematobium* after treatment with praziquantel. *Ann Soc Belg Med Trop.* 1989;69(1):57–65.
103. Fallon PG, Richardson EJ, Jones FM, Dunne DW. Dehydroepiandrosterone sulfate treatment of mice modulates infection with *Schistosoma mansoni*, *Clin Diagn Lab Immunol* , 1998, vol. 5 (pg. 251-3)
104. Boissier J, Chlichlia K, Digon Y, Ruppel A, Mone H. Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*, *Parasitol Res* , 2003, vol. 91 (pg. 144-50)
105. Remoue F, To Van D, Schacht AM, Picquet M, Garraud O, Vercruysse J, et al. Gender-dependent specific immune response during chronic human schistosomiasis haematobia, *Clin Exp Immunol* , 2001, vol. 124 (pg. 62-8)
106. Rollinson D, Klinger EV, Mgeni AF, Khamis IS, Stothard JR (2005). Urinary schistosomiasis on Zanzibar: application of two novel assays for the detection of excreted albumin and haemoglobin in urine. *J Helminthol* 79: 199–206.
107. Sobh MA, Moustafa FE, Razmy RM, Deelder AM, Ghoneim MA. *Schistosoma haematobium* induced glomerular disease: an experimental study in the golden hamster. *Nephron* 1991: 57:216-224.
108. Russell Stothard J, Sousa-Figueiredo JC, Simba Khamis I, Garba A, Rollinson D. Urinary schistosomiasis-associated morbidity in schoolchildren detected with urine albumin-to-creatinine ratio (UACR) reagent strips. *J Pediatr Urol* 2009; 5: 287-291.
109. Comper WD, Hilliard LM, Nikolic-Paterson DJ, Russo LM (2008) Disease-dependent mechanisms of albuminuria. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: 1589–1600.
110. Murare HM, Taylor P. Hematuria and proteinuria during *Schistosoma haematobium* infection: relationship to intensity of infection and the value of chemical reagent strips for pre and post-treatment diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 426-430.
111. Sousa-Figueiredo JC, Basañez MG, Simba Khamis I, Garba A, Rollinson D, Stothard JR. Measuring morbidity associated with urinary schistosomiasis: assessing levels of excreted urine albumin and urinary tract pathologies. *Plos Negl Trop Dis* 2009 Oct 6; 3(10):e526.
112. Wami WM, Nausch N, Midzi N, Gwisai R, Mduluza T, Woolhouse M, et al. Identifying and evaluating field indicators of urogenital schistosomiasis-related

morbidity in preschool-aged children. *Plos Negl Trop Dis* 2015 Mar 20;9(39): e0003649.

113. WHO. Community-directed interventions for major health problems in Africa: a multi-country study final report. Geneva: World Health Organization; 2008.

114. WHO. The Schistosomiasis Manual. Geneva: World Health Organization; 1995

115. Tchuente-Tchuenté LA, N’Goran EK. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis control in Cameroon and Cote d’Ivoire: implementing control on a limited budget. *Parasitology*. 2009;136:1739–1745

116. Kihara J, Mwandawiro C, Waweru B, Gitonga CW, Brooker S. Preparing for national school-based deworming in Kenya: the validation and large-scale distribution of school questionnaires with urinary schistosomiasis. *Trop Med Int Health* 2011 Oct; 16(10): 1326-33.

117. Lengeler C, Utzinger J, Tanner M. Questionnaires for rapid screening of schistosomiasis in sub-Saharan Africa. *Bulletin of the World Health Organization*. 2002;80:235–242.

118. Brooker S, Kabatereine NB, Gyapong JO, Stothard JR, Utzinger J. Rapid mapping of schistosomiasis and other neglected tropical diseases in the context of integrated control programmes in Africa. *Parasitology*. 2009a;136:S1707–S1718.

119. Reimert CM, Mshinda HM, Hatz CF, Kombe Y, Nkuilla T, Poulsen LK, et al. Quantitative assessment of eosinophiluria in *Schistosoma haematobium* infections: a new marker of infection and bladder morbidity. *Am J Trop Med Hyg*. 2000 Jan;62(1):19-28.

120. King CH, Lombardi G, Lombardi C, Greenblatt R, Hodder S, Kinyanjui H, et al (1988) Chemotherapy-based control of schistosomiasis haematobia. I. Metrifonate versus praziquantel in control of intensity and prevalence of infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 39, 295–305.

121. Danso-Appiah A, Utzinger J, Liu J, Olliaro P (2008). Drugs for treating urinary schistosomiasis. *Cochrane Database Syst Rev*: CD000053

122. Hagan P, Blumenthal UJ, Dunn D, Simpson AJ, Wilkins HA (1991). Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature*, London 349, 243-5.

123. Guyatt HL, Smith T, Gryseels B, Lengeler C, Mshinda H, Siziya S, et al, 1995. Aggregation in schistosomiasis: comparison of the relationships between prevalence and intensity in different endemic areas. *Parasitology* 109: 45–55.

124. Caldas IR, Campi-Azavedo AC, Oliveira LF, Silveira AM, Oliveira RC, Gazzinelli G. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop* 2008 Nov-Dec;108(2-3):109-17.
125. Mutapi F, Maizels R, Fenwick A, Woolhouse M. Human schistosomiasis in the post mass drug administration era. *Lancet Infect Dis*. 2017 Feb; 17(2):e42-e48.
126. Colley DG, Secor WE. Immunology of human schistosomiasis. *Parasite Immunol*. 2014 Aug;36(8):347-57.
127. Magak P, Chang-Cojulun A, Kadzo H, Ileri E, Muchiri E, Kitron U, et al. Case-control study of posttreatment regression of urinary tract morbidity among adults in *Schistosoma haematobium*-endemic communities in Kwale County, Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 2015; 93(2):371-376.
128. World Health Organization. Assessing the efficacy of anthelmintic drugs against schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis 2013. Geneva: World Health Organization; 2013.
129. Olliaro PL, Vaillant MT, Belizario VJ, Lwambo NJ, Ouldabdallahi M, Pieri OS, et al. A multicentre randomized controlled trial of the efficacy and safety of single dose praziquantel at 40 mg/kg vs. 60 mg/kg for treating intestinal schistosomiasis in the Philippines, Mauritania, Tanzania and Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(6):1165.
130. Garba A, Lamine MS, Barkiré N, Djibo A, Sofu B, Gouvras AN, et al. Efficacy and safety of two closely spaced doses of praziquantel against *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni* and re-infection patterns in school-aged children in Niger. *Acta Trop*. 2013; 128(2):334–44.
131. Wami WE, Nausch N, Midzi N, Gwisai R, Mduluzi T, Woolhouse ME, et al. Comparative Assessment of Health Benefits of Praziquantel Treatment of Urogenital Schistosomiasis in Preschool and Primary School-Aged Children. *Biomed Res Int*. 2016 Aug 18:9162631.
132. CDI Study Group Community-directed interventions for priority health problems in Africa: results of a multicountry study. *Bull World Health Organ*. 2010;88(7):509–18.
133. Odhiambo GO, Musuva RM, Odiere MR, Mwinzi PN. Experiences and perspectives of community health workers from implementing treatment for schistosomiasis using the community directed intervention strategy in an informal settlement in Kisumu City, western Kenya. *BMC Public Health*. 2016 Sep 15;16:986.

134. Dabo A, Bary B, Kouriba B, Sankaré O, Doumbo O. Factors associated with coverage of praziquantel for schistosomiasis control in the community-direct intervention (CDI) approach in Mali (West Africa) *Infect Dis Poverty*. 2013;2:11.
135. Sturrock RF. Current concepts of snail control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995;90:241–248.
136. Ross AGP, Bartley PB, Sleigh AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, et al. Schistosomiasis. *N Eng J Med* 2002; 346: 1212–19.
137. Doenhoff MJ, Hagan P, Cioli D, Southgate V, Pica-Matocchia L, Botros S, et al. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub Saharan Africa and current research needs. *Parasitology* 2009; 136: 1825–35.
138. Gray DJ, McManus DP, Li Y, Williams GM, Bergquist R, Ross AG. Schistosomiasis elimination: lessons from the past to guide the future. *Lancet Infect Dis*. 2010 Oct; 10(10):733-6.
139. Garba A, Tour. S, Dembelé R, Boisier P, Tohon Z, Bosqué-Oliva E, et al. Present and future schistosomiasis control activities with support from the schistosomiasis control initiative in west Africa. *Parasitology* 2009; 136: 1731–37.
140. Guo JG, Cao CL, Hu GH, Lin H, Li D, Zhu R, et al. The role of passive chemotherapy plus health education for schistosomiasis control in China during maintenance and consolidation phase. *Acta Trop* 2005; 96: 177–83.
141. Tallo VL, Carabin H, Alday PP, Balolong E, Olveda Rm, McGarvey ST. Is mass treatment the appropriate schistosomiasis elimination strategy?. *Bull World Health Organ*. 2008 Oct;86(10):765-71.
142. Smits HL. Prospects for the control of neglected tropical diseases by mass drug administration. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009 Feb; 7(1):37-56.

12. ANEXO

Epidemiología de la esquistosomiasis y utilidad de los tests de diagnóstico indirecto en niños en edad escolar en Cubal, Angola.

RESEARCH ARTICLE

Epidemiology of Schistosomiasis and Usefulness of Indirect Diagnostic Tests in School-Age Children in Cubal, Central Angola

Cristina Bocanegra^{1*}, Sara Gallego², Jacobo Mendioroz³, Milagros Moreno², Elena Sulleiro⁴, Fernando Salvador⁵, Nicolau Sikaleta², Arlette Nindia², Daniel Tchipita², Morais Joromba², Sebastiao Kavaya², Adrián Sánchez Montalvá⁵, Teresa López², Israel Molina⁵

1 Special Program for Infectious Diseases Drassanes-Vall d'Hebron. PROSICS Barcelona, Spain/Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal, Angola, **2** Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal, Angola, **3** Epidemiology Department. University Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain, **4** Microbiology Department. University Hospital Vall d'Hebron. PROSICS Barcelona, Spain, **5** Infectious Diseases Department. University Hospital Vall d'Hebron. PROSICS Barcelona, Spain

* cristinabocanegra@gmail.com



 OPEN ACCESS

Citation: Bocanegra C, Gallego S, Mendioroz J, Moreno M, Sulleiro E, Salvador F, et al. (2015) Epidemiology of Schistosomiasis and Usefulness of Indirect Diagnostic Tests in School-Age Children in Cubal, Central Angola. *PLoS Negl Trop Dis* 9(10): e0004055. doi:10.1371/journal.pntd.0004055

Editor: Song Liang, University of Florida, UNITED STATES

Received: January 14, 2015

Accepted: August 14, 2015

Published: October 16, 2015

Copyright: © 2015 Bocanegra et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its supporting information files.

Funding: The authors received no specific funding for this work. Materials were provided by Hospital Nossa Senhora da Paz, integrated in the Angolan Public System of Health. None of the researchers received a salary or financial support for their work.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist

Abstract

Introduction

Schistosomiasis remains a public health major problem and little is known in many areas, mainly in Sub-Saharan Africa

Objectives

To assess the burden and risk factors of schistosomiasis and intestinal parasitic helminthes in the children of Cubal, Angola, and to compare different diagnostic approaches for urinary schistosomiasis under field conditions.

Methods

A cross-sectional study was conducted. Urine and faeces samples of school children were microscopically studied. A random sample of children was obtained from an alphabetically arranged list of children, taking one of two children. Urine dipstick, colorimetric test and macrohaematuria were considered as indirect diagnostic methods and compared to direct urine examination. Possible risk factors for the infection were sex, age, distance to the river and previous treatment with praziquantel; the assessment was performed using Chi-square test.

Results

A total of 785 (61.18%) children showed *S. haematobium* eggs in urine; children living within 500 meters from the river had a higher odds for infection: Odds ratio 1.97 (1.45–2.7 CI 95%); urine dipstick showed sensitivity of 96% and specificity of 61.3%, with a positive predictive value; colorimetric test showed sensitivity of 52.5%, specificity of 74.6% and a

positive predictive value of 77%. Proteinuria was present in 653 (51.1%) children, being more frequent in children with *S. haematobium* in urine (75.2%); 32 of 191 stool samples (16%) showed the presence of other intestinal parasites and 8 (4%) for *S. haematobium*.

Conclusions

Prevalence of urinary schistosomiasis in our study area is much higher than the national average, considering it as a high-risk community. Proximity to a source of water was a risk factor for the infection. Indirect tests, as urine dipstick and colorimetric test, were useful tools for diagnosis, due to ease of use and low cost. Proteinuria was a common finding, probably showing an early structural damage due to schistosomiasis in this group of children.

Author Summary

Schistosomiasis is a parasitic disease that affects both the individual and the community as a whole. Its transmission and life cycle depend on non-safe water, as infection is acquired bathing in fresh water. As in many neglected diseases, information about it is scarce in many areas, mainly in Sub-Saharan Africa. It is the case in Angola, where a prolonged civil war has hampered development and research for many years. This paper highlights the epidemiology of the disease in Cubal, main town of a rural area in central Angola. It shows a very high prevalence of urinary schistosomiasis in the school-age population of the area; the risk is higher among the children living closer to one source of water. This population must be considered as a high-risk community for the development of complications. We advocate for the use of indirect tests for diagnosis, as urine dipstick and colorimetric test, due to their easiness of use and low price. At the same time, it relates the presence of the disease with signs of severity that are usually observed at an older age, suggesting that prevention must be initiated as soon as possible. Overall, this paper will provide the research and medical community with essential data for future intervention strategies to manage schistosomiasis in the region.

Introduction

Human schistosomiasis remains, after malaria, one of the main sources of morbidity and mortality in endemic countries, with major consequences on public health and economy, especially in Sub-Saharan Africa. It is considered as one of the most prevalent parasitic infections in the world with about 200 million people infected and 20 million with a severe form of the disease. In Sub-Saharan Africa, it is estimated that more than 200,000 deaths per year are due to schistosomiasis [1]. Other consequences of the disease, as anemia, chronic pain, growth stunting and nutritional and cognitive impairment have also been recently demonstrated affecting not only the individual, but also the community as a whole, hampering its development and perpetuating poverty [2,3].

In 1984 the WHO Expert Committee for the Control of Schistosomiasis approved a strategy for morbidity control, mainly based on periodic mass treatment in school-aged children, due to the availability of safe and effective drugs, and ease to administer in a single dose [4]. Then, one of the first steps required to eliminate the disease is a study of the local characteristics of

the disease, in order to maximize the impact of the public health measures such as mass drug administration of praziquantel, by prioritizing the places with a higher prevalence. Although schistosomiasis may be eradicated in focal areas through current mass drug administration programmes, global control and elimination will require an integrated approach with multifactorial and coordinated interventions. Thus, reliable data on the epidemiology of the disease will be useful for further actions.

However, these data are scarce in Sub-Saharan Africa and especially in Angola, where there has only been a single recent study, performed in the north of the country, which informed of the existence of both intestinal and urinary types of schistosomiasis [5]. A recent national survey was conducted by the Ministry of Health in order to determine the impact of mass drug administration campaigns as per the National Neglected Tropical Diseases guidelines. The estimated overall prevalence of urinary schistosomiasis was 28% [6]. Data regarding urinary schistosomiasis in Cubal district, in Central Angola, are also scarce and come from old studies performed in the 1970s, with an estimated prevalence between 35% and 85% [7]. Concerning intestinal schistosomiasis, there are only isolated reports⁷. Prevalence and intensity of the infection and description of intermediate hosts are unknown. The main aim of this study was to determine the prevalence of urinary and intestinal schistosomiasis and other intestinal parasitic infections in the children of Cubal. Other objectives were to compare different diagnostic approaches under field conditions and the assessment of risk factors related to the infection.

Methods

A cross-sectional study was conducted between March 2013 and February 2014 in Cubal, the capital city of the district.

Study population and data collection

The district of Cubal is situated in western-central Angola. It has an estimated population of 322,000 with 151,000 (47%) children under 15 [8]. In a primary field approach to possible schistosomiasis infection sources, we noted a pond in the northeastern area of the city, and the Cubal River, which crosses the city by its southern border. We found no other water facility nearby used by the local population.

Children studying in years 4 and 5, corresponding to 9–10 years old, were recruited in every school in Cubal. In order to be representative, we screened at least 50 children in each class, from a total of approximately 100 children in each class. We randomly selected one of consecutive pairs of children, in alphabetical order. Samples were collected during daily classes.

Participation in the study was voluntary, and with prior parental consent. We excluded children whose parents or legal guardians objected to their participation. Age, sex, school and neighbourhood of each child, as well as previous treatments with albendazole/mebendazole or praziquantel within the two previous months, were recorded. Distance from their neighbourhood to a source of water was estimated on a local actualized map.

Sample size calculation

Sample size calculation was based on the estimated prevalence recorded in the recent National Survey. For a local prevalence of schistosomiasis of 30% [6], sample size was estimated as 1,280 children under 15 years old for a margin of error of 2.5% (95% confidence interval, [CI 95%]). In order to avoid missing data, finally 1,425 cases were recorded.

Urine analysis for *Schistosoma haematobium* detection

Urine samples were requested from all children included in the survey. Micro and macrohaematuria were evaluated for the initial detection of schistosomiasis through three indirect tests: a colorimetric test, a urine dipstick test, and the visual examination of urine by the researchers.

In the colorimetric test, a picture with six haematuric and non-haematuric urines was shown to the children to identify what colour corresponded to their daily urine. Urine colours 1, 2 and 3 were considered non-haematuric and urine colours 4, 5 and 6 haematuric.

Microscopic haematuria was detected through urine dipstick test (Combi-Screen 11SYS). The results were expressed with a number of crosses, with one cross denoting 5–10 erythrocytes per field; two crosses denoting 50 erythrocytes per field and three crosses denoting 300 erythrocytes per field. The same dipstick also detected proteinuria (1 cross = 30 mg/dL; 2 crosses = 100 mg/dL; 3 crosses = 300 mg/dL).

Macroscopic haematuria was determined by one trained researcher. Two blinded independent researchers examined with optical microscopy all the urine samples that had micro/macrohaematuria in at least one of the indirect tests.

The definitive diagnosis of urinary schistosomiasis was made if *S. haematobium* eggs were present on the sample. To optimize resources, only one of every five urine samples with three negative results in the indirect tests for haematuria was examined.

Stool diagnostic technique for schistosomiasis and other parasitic infections

Stool samples were requested from one in two of the selected children. Microscopical examination was performed with the formol-ether diagnostic method by the same two blinded researchers.

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as means and standard deviations (SD). The estimated prevalence of schistosomiasis was calculated overall and stratified by age, gender, school and neighbourhood. The normal distribution of quantitative variables was tested through the Shapiro–Wilk test. Differences of normally distributed variables between groups were evaluated with *t*-tests and ANOVA. For the non-normally distributed variables, differences were evaluated with the Mann–Whitney U test. Differences on infection status, and odds ratio were evaluated with Chi-square tests. We considered as possible risk factors of infection sex, age, distance to one of the two possible sources of water (pond and river) and previous treatment with praziquantel. The assessment of factors associated with infection was performed using Chi-square tests.

Sensitivity, specificity, positive predictive value and positive and negative likelihood ratios of the three indirect tests were determined using direct microscopical observation of *S. haematobium* eggs as the gold standard technique. Comparison of sensitivity, specificity, positive and negative predictive value of the different diagnostic approaches was made based on magnitude; no specific statistical testing was performed.

Data collection and calculations were performed using EpiInfo™ version 7 and STATA version 11.

Ethical aspects

The project was approved by the Vall d’Hebron Research Institute Ethics Committee and by the Health and Education regional institutions. We conducted previous informative talks with

school principals, teachers, parents, and community leaders; informed consent was obtained from all parents or legal guardians. Every student diagnosed with schistosomiasis or intestinal parasites received appropriate treatment.

Results

Characteristics of the study population

A total of 1,425 children from 19 schools were initially included in the study. Participation ranged from 29 to 192 children among the different schools. Due to drop outs during the recruitment process, urine samples were finally obtained from 1,283 children (90%) and stool samples from 191 children (13.4%). A total of 655 (51.05%) children were boys. Mean age was 8.7 years (SD 3.2). Only 65 children (4.5%) reported receiving treatment with praziquantel in the two previous months and 22 (1.5%) with mebendazole or albendazole.

Prevalence of urinary schistosomiasis

Seven hundred and eighty five children were considered to be infected by *S. haematobium*. A crude assessment of prevalence of schistosomiasis infection in the school age population of Cubal considering only the samples analysed was 61.18% (CI 95%; 58.4–63.9). The prevalence of urinary schistosomiasis in each neighbourhood of the city of Cubal is shown on [Fig 1](#). As *S. haematobium* eggs were found by microscopy in 15.5% of the samples with three previous negative tests, the true prevalence can be as high as 63.5% if the distribution for negative indirect tests is maintained. No statistical differences were found on the distribution of the infection by sex, age or previous treatment with praziquantel. Proximity to a source of water was associated with an increased likelihood of infection (Odds ratio 1.97 (1.45–2.70) $p < 0.001$). These data are shown in [Table 1](#).

Estimated global prevalence of schistosomiasis through indirect tests

Colorimetric test. We made a total of 1,283 colorimetric tests. Among these, 539 children (42%) reported haematuric urine (39.3–44.8, CI 95%).

Micro/macro haematuria. A total of 1,283 urine samples were observed for macroscopic and microscopic haematuria. The dipstick urine test showed one cross of haematuria in 189 samples (14.7%); two crosses on 131 (10.24%) and three crosses on 524 (40.96%). Therefore, 844 samples were positive for microhaematuria equating to an estimated prevalence of 65.7% (59.8–72.7, CI 95%). Macroscopic observation of haematuria was positive on 219 samples, equating to an estimated global prevalence of 17.06% (15.15–19.35, CI 95%).

Sensitivity, specificity, positive predictive value, false positives and negative and positive likelihood ratios of all indirect tests compared with the gold standard (direct visualization of *S. haematobium* eggs) are detailed in [Table 2](#).

Considering proteinuria, 1,283 tests were performed. Six hundred and fifty-three (51.1%) samples were positive, 244 (19.1%) had one cross, 220 (17.2%) two crosses and 189 (14.8%) three crosses. Proteinuria was found more frequently in the over-11 child age group (57.3%) and less frequently in the under-five group (33%). The more severe degree of infection (three crosses) was also more frequent in this group (21.5%). Also, it was much more frequent in the children that had *S. haematobium* eggs in urine (75.2%). The relationship between the degree of proteinuria with age and detection of *S. haematobium* eggs in urine samples is shown in [Table 3](#).

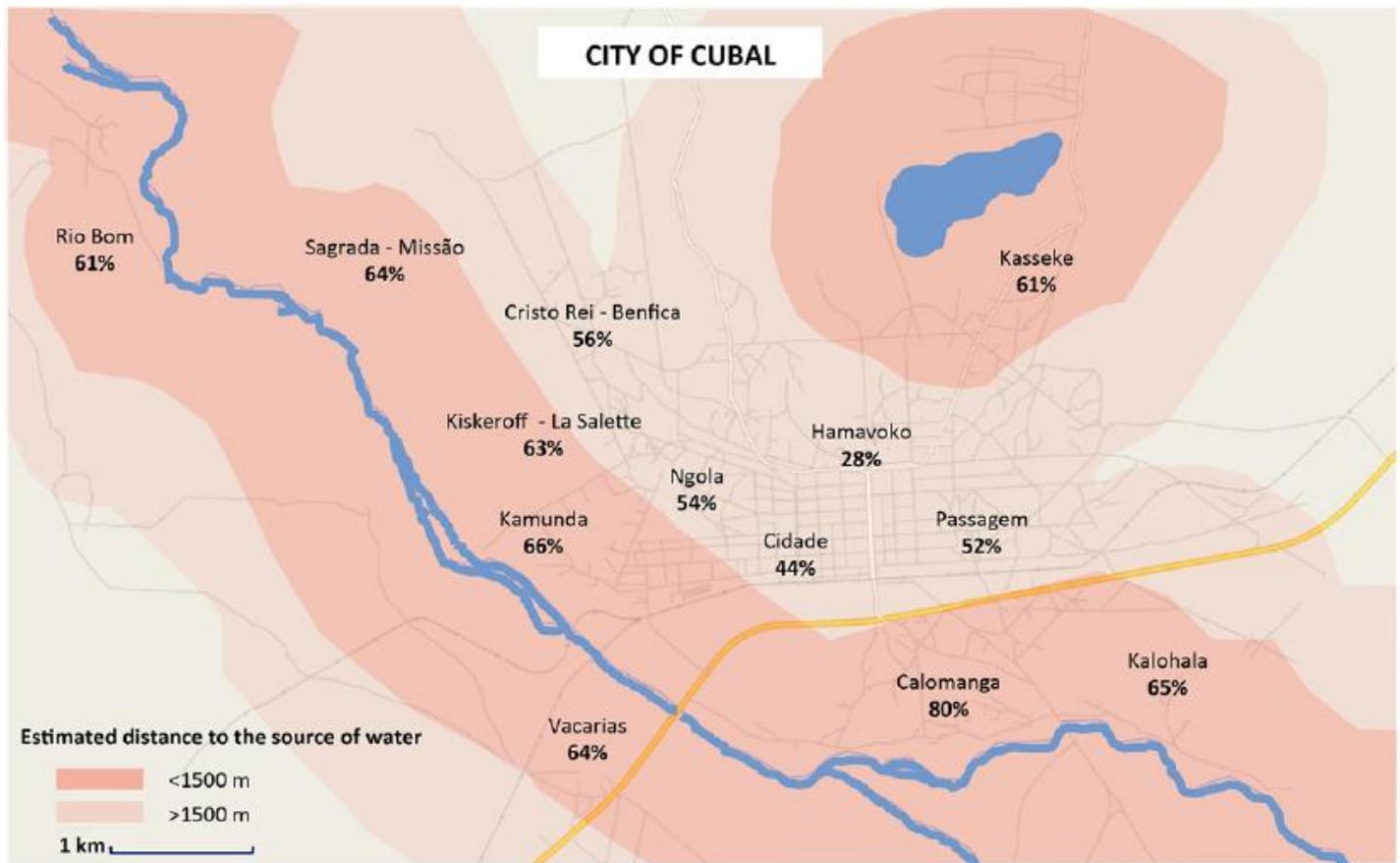


Fig 1. Prevalence of urinary schistosomiasis considering 13 distinct neighborhoods and their relationship to the sources of water.

doi:10.1371/journal.pntd.0004055.g001

Other parasites' infection prevalence

One hundred and ninety-one stool samples were collected. None was positive for *S. mansoni*; Eight (4%) were positive for *S. haematobium*. The prevalence of various species of intestinal parasites was 16.7% (12.5--23.7 CI 95%), as in [Table 4](#).

Discussion

The prevalence of urinary schistosomiasis in the studied population (61%) is very high, much higher than the national average (28%); these data imply that urinary schistosomiasis is a major public health problem in the area; according to the WHO guidelines [9] the population as a whole must be considered as a high-risk community and annual treatment campaigns should be initiated. Furthermore, these data should be used as a baseline for implementation of a wide range of measures that have been proven effective for schistosomiasis control, such as health education, clean water supply facilities, sanitation and ecological intervention when possible [10]. Further studies are needed in order to obtain data about related morbidity and mortality, or prevalence in other age groups. Cubal River surrounds the city of Cubal; throughout its course it forms a significant number of water bodies appropriate for bathing; there is also a pond in the north of the city where people wash their clothes. Once all the risk factors were evaluated, the proximity to one of these sources of water was the only one associated with urinary schistosomiasis. Proximity to a source of water where snail habitats flourish and people

Table 1. Risk factors for schistosomiasis infection.

	Total screened children n: 1.425	Number of children infected by <i>S.haematobium</i> n: 785	OR (CI 95%)	p
Gender				
Girls	710	390/710 (54.9%)	1.08 (0.86–1.35)	0.55
Age				
= <5	81	49/81 (60.4%)	1	
6–8	434	248/434 (57.1%)	0.84 (0.50–1.40)	0.59
9–11	568	319/568 (56.1%)	0.64 (0.39–1.06)	0.11
>11	265	169/265 (63.7%)	1.05 (0.62–1.80)	0.94
Unknown	77			
Distance to the source of water				
>1500	219	108/219 (49.3%)	1	
1000–1500m	162	87/162 (53.7%)	1.19 (0.79–1.70)	0.45
500–1000m	158	102/158 (64.6%)	1.87 (1.22–2.84)	<0.05
<500m	742	488/742 (65.7%)	1.95 (1.43–2.64)	<0.001
Unknown	0			
Previous treatment with Praziquantel				
Treated	65	38/65 (58.2%)	0.89 (0.54–1.48)	0.75
Unknown	111			

OR: odds ratio. CI: confidence interval.

doi:10.1371/journal.pntd.0004055.t001

are exposed to the water correlates with areas of high human schistosomiasis prevalence [11,12]; this has also been shown to be the case in other endemic areas in northern Angola, mainly endemic for *S. haematobium* [5]. Although not surprising, to highlight the river and the pond as transmission areas for urinary schistosomiasis might provide a useful baseline for future malacological studies and ecological interventions, including detection of hot-spots where environmental intervention could have an impact. No differences of prevalence were found in relation to age or gender, even considering children younger than five years old (despite the low number of children in this group of age included in this analysis). These results reinforce the idea that transmission in the area is really high. This has been shown in areas highly endemic for intestinal and urinary schistosomiasis [13,14]. Further studies should be performed to assess the prevalence, disease burden, and safety and efficacy of treatment in pre-school-age children, as they are not usually included in official mass treatment campaigns.

Regarding the different indirect diagnostic tests, the most useful was the urine dipstick, with a sensitivity of 96% and a specificity of 61%; these results are similar to others reported in previous studies [15–17]. Because of its accuracy, ease of use and quick interpretation it can be considered as a reliable marker for the rapid diagnosis of urinary schistosomiasis in a

Table 2. Indirect tests utility compared to gold standard (urine parasitological examination).

	Positive tests/ tests performed	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive predictive value (%)	False positive (%)	Positive likelihood ratio	Negative likelihood ratio
Urine dipstick	844/1283	96.0	61.3	88.8	11.1	5.09	0.05
Haematuria	219/1283	27.1	97.5	97.2	0.2	22.63	0.74
Colorimetric test	539/1283	52.5	74.6	77.0	20.3	2.07	0.64
Gold standard (Direct examination)	785/1283						

doi:10.1371/journal.pntd.0004055.t002

Table 3. Relationship of proteinuria with other parameters.

Samples with proteinuria (n %)	Age				P	Eggs of <i>Schistosoma haematobium</i>		
	= <5 n = 39	6–8 n = 406	9–11 n = 537	>= 12 n = 260		Positive n = 785	Negative n = 498	P
+ (30 mg/dL)	5 (12.8%)	74 (16.7%)	105 (19.6%)	60 (23.1%)	<0.01	197 (25.2%)	47 (9.4%)	<0.01
++ (100 mg/dL)	6 (15.4%)	92 (20.8%)	89 (16.6%)	33 (12.7%)		209 (26.6%)	12 (2.4%)	
+++ (300 mg/dL)	2 (5.1%)	75 (16.9%)	56 (10.4%)	56 (21.5%)		186 (23.7%)	6 (1.2%)	
Positive	13 (33.3%)	241 (54.4%)	250 (46.6%)	149 (57.3%)		592 (75.4%)	65 (13.0%)	
Negative	26 (66.7%)	202 (45.6%)	287(53.4%)	111 (42.7%)		193 (24.5%)	433 (87.0%)	
TOTAL	39 (100%)	406 (100%)	537 (100%)	260 (100%)		785 (100%)	498 (100%)	

doi:10.1371/journal.pntd.0004055.t003

low-resource, highly endemic context. The colorimetric test showed a lower performance, with a sensitivity of 52% and a specificity of 75%; nevertheless, its positive predictive value was 77%; despite its limitations, this test offers several advantages, mainly its ease of use, even by non-qualified staff, at a much lower cost, as no laboratory material or infrastructure is needed. Moreover, it can be conducted directly in the field, so treatment can be administered at the same time. This method has been previously reported [18, 19] and it is accepted as a useful tool in high-endemic areas where application of multifaceted approaches is needed in order to optimize resources. For such cases, we propose a combination of methods, in order to reach as many infected children as possible; if urine is haematuric, treatment could be directly administered; in campaigns in highly affected neighbourhoods, treatment based on the colorimetric test could be a reasonable approach, though cost-effectiveness studies should be conducted in the area. Urine dipstick testing, if available, is a reasonable approach to diagnosis in the absence of rapid access to microscopy.

Interestingly, 51% of the samples showed some degree of proteinuria; most of these cases presented concomitantly haematuria and *S. haematobium* eggs and the older children were more affected; the relationship of *S. haematobium* presence and proteinuria has been shown previously [20, 21], but further studies are required to determine whether the presence of proteinuria is associated with structural damage in the upper urinary tract, or a worse prognosis, even at such a young age.

Despite urinary schistosomiasis and macroscopic haematuria being common among children in the community, very few had received treatment with praziquantel (4.5% in the previous two months), showing the lack of preventive chemotherapy use in the area [6]. Further studies of the knowledge and beliefs about the disease among community and health workers could help to guide future educational campaigns [22, 23].

Table 4. Prevalence of intestinal parasites.

Parasite	N	(%)	CI 95%
Hookworm	11	5.79	2.93–10.12
<i>Hymenolepis nana</i>	10	5.26	2.55–9.47
<i>Taenia</i> sp.	5	2.63	0.86–6.03
<i>Ascaris lumbricoides</i>	5	2.63	0.86–6.03
<i>Hymenolepis diminuta</i>	2	1.05	0.13–3.75
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1	0.53	0.01–2.90

CI = Confidence Interval

doi:10.1371/journal.pntd.0004055.t004

We did not detect the presence of intestinal schistosomiasis in the study area; this finding is consistent with the clinical impression and with previous reports [5, 7], given that both species of schistosomiasis are present in different regions in Angola, showing a patchy distribution. This is possibly due to geographical and ecological factors, but it should be confirmed with malacological studies which could identify the specific species of fresh water snails present in the area.

Although other parasitic infections were not rare (16.75%) in the studied population, prevalence was lower than the national average (40% in school-aged children [6]), mainly in the case of *Strongyloides stercoralis*. This lower ratio could be explained by diverse factors. We do not believe that previous treatment could be the reason, as geohelminths mass treatment campaigns have not been implemented on a regular basis in this area and only 1.5% children had taken any antihelminthic treatment in the two previous months; the difficulty in collecting faecal samples, which conditioned a low number of specimens, and the processing technique used (formol-ether) in only one sample are likely reasons for the underestimation of the prevalence of geohelminths, mainly for *Strongyloides stercoralis* [24], as larvae of this parasite are better visualized on direct examination. These are the main limitations of this study. A secondary survey focused on intestinal helminths is warranted, in order to assess more precisely the prevalence and intensity levels of infection.

A not negligible amount of *S. haematobium* eggs in faeces was found. This is probably the result of a hyperparasitization that leads to migration of parasites to the intestinal vessels; this phenomenon can be explained by a spill-over caused by high loads of parasites [25]. Another possible explanation, however less likely, might be contamination of faeces with urine, mainly in the case of girls or very small children; however, this is not supported by the study's data, as 6/8 (75%) children with *S. haematobium* eggs in faeces were boys and 8/8 (100%) were eight or more years old. An explanation that has been suggested in other studies is sexual interaction between the two species of schistosomes (*S. haematobium* and *S. mansoni*) [26, 27], but this is unlikely in this study, as no *S. mansoni* was diagnosed. More studies are required to determine whether different species of snails than previously described could have a role in these cases.

This survey is one of the few studies conducted in Angola into the epidemiology of neglected tropical diseases, particularly schistosomiasis. It is the result of a coordinated effort between educational authorities and the local administration and this is one of its main strengths, as it allowed for successful planning and implementation of the study, as well as a good way to approach the community facilitating educational tasks. More importantly, such collaboration will be essential for future interventions that are warranted in the community, such as implementation of preventive therapy, ecological studies or educational tasks. Additional information, such as socio-economic characteristics, life habits in relation to the use of water and latrines should be included in further surveys.

Conclusions

The prevalence of urinary schistosomiasis in the school-age population of Cubal, Angola, is very high, indicating the need for urgent intervention at a public health level, the major risk factor being the proximity to one of the main sources of water. Indirect tests, such as urine dipstick and colorimetric tests are useful tools for diagnosis in this context. Further studies are needed in order to assess more accurately the prevalence of intestinal schistosomiasis and geohelminths.

Supporting Information

S1 Checklist. STROBE checklist.
(DOCX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CB MM IM. Performed the experiments: CB SG AN NS SK DT MJ. Analyzed the data: CB JM IM. Contributed reagents/materials/analysis tools: CB ES AN. Wrote the paper: CB SG JM FS ASM TL IM.

References

1. King CH, Dickman K, Tisch DJ. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *Lancet* 2005; 365:1561–9. PMID: [15866310](#)
2. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012; 380:2095–128. doi: [10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](#) PMID: [23245604](#)
3. Tohon ZB, Mainassara HB, Garba A, Mahamane AE, Bosqué-Oliva E, Ibrahim M-L, et al. Controlling schistosomiasis: significant decrease of anaemia prevalence one year after a single dose of praziquantel in Nigerian schoolchildren. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2:e241. doi: [10.1371/journal.pntd.0000241](#) PMID: [18509472](#)
4. WHO (2002) Prevention and Control of Schistosomiasis and Soil-Transmitted Helminthiasis. Report of a WHO Expert Committee. Geneva: World Health Organization.
5. Sousa-Figueiredo JC, Gamboa D, Pedro JM, Fançony C, Langa AJ, Magalhães RJS, et al. Epidemiology of malaria, schistosomiasis, geohelminths, anemia and malnutrition in the context of a demographic surveillance system in northern Angola. *PLoS ONE* 2012; 7:e33189. doi: [10.1371/journal.pone.0033189](#) PMID: [22493664](#)
6. MINSa, WFP, WHO, UNICEF (2005) Baseline survey for helminth control in school-aged children in Angola. Luanda: Ministerio de Saude
7. - Atlas of the global distribution of schistosomiasis. CEGET-CNRS/ OMS-WHO 1987.
8. - Perfil do Município do CUBAL, Província de Benguela 2009. Administração Municipal do Cubal, Edições de Angola Lda (EAL), Outubro 2009.
9. Montresor A., Crompton D.W.T., Hall A., Bundy D.A.P. and Savioli L. Guidelines for the evaluation of soil-transmitted helminthiasis and schistosomiasis at community level. WHO/CTD/SIP/98.1
10. Lee Y-H, Jeong HG, Kong WH, Lee S-H, Cho H-I, Nam H-S, et al. Reduction of urogenital schistosomiasis with an integrated control project in Sudan. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9:e3423. doi: [10.1371/journal.pntd.0003423](#) PMID: [25569278](#)
11. Opisa S, Odiere MR, Jura WGZO, Karanja DMS, Mwinzi PNM. Malacological survey and geographical distribution of vector snails for schistosomiasis within informal settlements of Kisumu City, western Kenya. *Parasit Vectors* 2011; 4:226. doi: [10.1186/1756-3305-4-226](#) PMID: [22152486](#)
12. Woodhall DM, Wiegand RE, Wellman M, Matey E, Abudho B, Karanja DMS, et al. Use of Geospatial Modeling to Predict *Schistosoma mansoni* Prevalence in Nyanza Province, Kenya. *PLoS One* 2013; 8.
13. Betson M, Sousa-Figueiredo JC, Kabatereine NB, Stothard JR. New Insights into the Molecular Epidemiology and Population Genetics of *Schistosoma mansoni* in Ugandan Pre-school Children and Mothers. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7.
14. Coulibaly JT, N'Gbesso YK, N'Guessan NA, Winkler MS, Utzinger J, N'Goran EK. Epidemiology of schistosomiasis in two high-risk communities of south Cote d'Ivoire with particular emphasis on pre-school-aged children. *Am J Trop Med Hyg* 2013; 89:32–41. doi: [10.4269/ajtmh.12-0346](#) PMID: [23690549](#)
15. Lwambo NJS, Savioli L, Kisumku UM, Alawi KS, Bundy DAP (1997). Control of *Schistosoma haematobium* morbidity on Pemba Island: validity and efficiency of indirect screening tests. *Bull World Health Organ* 75: 247–252. PMID: [9277012](#)
16. Mafe MA. The diagnostic potential of three indirect tests for urinary schistosomiasis in Nigeria. *Acta Trop* 1997; 68:277–84. PMID: [9492912](#)
17. King CH, Bertsch D. Meta-analysis of urine heme dipstick diagnosis of *Schistosoma haematobium* infection, including low-prevalence and previously-treated populations. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7: e2431. doi: [10.1371/journal.pntd.0002431](#) PMID: [24069486](#)
18. Lengeler C, Utzinger J & Tanner M (2002) Questionnaires for rapid screening of schistosomiasis in sub-Saharan Africa. *Bulletin of the World Health Organization* 80, 235–242 PMID: [11984610](#)
19. Kihara J, Mwandawiro C, Waweru B, Gitonga CW, Brooker S. Preparing for national school-based deworming in Kenya: the validation and large-scale distribution of school questionnaires with urinary

- schistosomiasis. *Tropical Medicine and International Health*. Volume 16 no 10 pp 1326–1333 october 2011. doi: [10.1111/j.1365-3156.2011.02829.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2011.02829.x) PMID: [21767334](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21767334/)
20. Wami WM, Nausch N, Midzi N, Gwisai R, Mduluza T, Woolhouse M, et al. Identifying and evaluating field indicators of urogenital schistosomiasis-related morbidity in preschool-aged children. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9:e0003649. doi: [10.1371/journal.pntd.0003649](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003649) PMID: [25793584](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25793584/)
 21. Brouwer KC, Ndhlovu PD, Wagatsuma Y, Munatsi A, Shiff CJ. Epidemiological assessment of Schistosoma haematobium-induced kidney and bladder pathology in rural Zimbabwe. *Acta Trop* 2003; 85:339–47. PMID: [12659971](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12659971/)
 22. Ormedo M, Ogutu M, Awiti A, Musuva R, Muchiri G, Montgomery SP, et al. The effect of a health communication campaign on compliance with mass drug administration for schistosomiasis control in western Kenya—the SCORE project. *Am J Trop Med Hyg* 2014; 91:982–8. doi: [10.4269/ajtmh.14-0136](https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0136) PMID: [25246690](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25246690/)
 23. Yuan L-P, Manderson L, Ren M-Y, Li G-P, Yu D-B, Fang J-C. School-based interventions to enhance knowledge and improve case management of schistosomiasis: a case study from Hunan, China. *Acta Trop* 2005; 96:248–54. PMID: [16202594](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16202594/)
 24. Krolewiecki AJ, Lammie P, Jacobson J, Gabrielli A-F, Levecke B, Socias E, et al. A public health response against Strongyloides stercoralis: time to look at soil-transmitted helminthiasis in full. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7:e2165. doi: [10.1371/journal.pntd.0002165](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002165) PMID: [23675541](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23675541/)
 25. Husting EL. Comments on “the routes of schistosome egg passage...” *Cent Afr J Med* 1965; 11:250–4. PMID: [5833090](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5833090/)
 26. Cunin P, Tchuem Tchuente L-A, Poste B, Djibrilla K, Martin PMV. Interactions between Schistosoma haematobium and Schistosoma mansoni in humans in north Cameroon. *Trop Med Int Health* 2003; 8:1110–7. PMID: [14641846](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14641846/)
 27. Webster BL, Southgate VR, Tchuem Tchuente LA. Mating interactions between Schistosoma haematobium and S. mansoni. *J Helminthol* 1999; 73:351–6. PMID: [10654406](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10654406/)

