

Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von
***Plasmodium berghei*, *Plasmodium chabaudi*, *Plasmodium yoelii* und**
Plasmodium vinckei
als Spender- oder Empfängerorganismen
gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV

Allgemeines

Bei *Plasmodium berghei*, *Plasmodium chabaudi*, *Plasmodium yoelii* und *Plasmodium vinckei* handelt es sich um einzellige Parasiten, die zur Untergattung *Vinckei* der Gattung *Plasmodium* in der Familie der *Plasmodiidae* gehören.

Der Wirtsbereich beschränkt sich auf murine Nagetiere, in denen sie Malaria auslösen. Als natürlicher Hauptwirt war bis vor kurzem (außer für *P. berghei*) fast ausnahmslos die Dickichtratte *Grammomys poensis* (früher *Thamomys rutilans*) Zentralafrikas beschrieben [1]. Inzwischen wurde in einer Studie gezeigt, dass zumindest für *P. yoelii* und *P. vinckei* als natürlicher Wirt auch die Echte Streifengrasmaus (*Lemniscomys striatus*), die Natal-Vielzitzenmaus (*Mastomys natalensis*), die Afrikanische Weichratte (*Praomys* sp.) sowie die in Afrika invasive Spezies der Hausmaus (*Mus musculus*) dienen und somit vermutlich für alle Nagetier-Plasmodien weitere natürliche murine Wirtstiere existieren [1]. Experimentelle Infektionen von Mäusen, Hamstern und anderen Rattenspezies bestätigen dies [2–4].

Eine Übertragung zwischen den Wirtstieren erfolgt vektorbasiert. Bis 2019 war als einziger natürlicher Vektor die Stechmücke *Anopheles durenii millescampsii* beschrieben. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden jedoch als weitere Vektoren *A. moucheti*, *A. nili*, *A. gabonensis*, *A. vinckei* und *A. marshalii* beschrieben und vermutet, dass neben diesen noch weitere *Anopheles*-Spezies eine Rolle bei der natürlichen Übertragung spielen [1]. Dafür spricht auch, dass experimentell eine Vielzahl weiterer *Anopheles*-Spezies, wie z. B. *A. stephensi* als Vektor genutzt werden können [5].

Die Genome von *P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. yoelii* und *P. vinckei* sind sequenziert und zeigen eine hohe Übereinstimmung mit dem Genom des humanen Malaria-Parasiten *Plasmodium falciparum* [6–9]. Dies spiegelt sich auch in ihrer Biologie wieder, die viele Gemeinsamkeiten mit den humanpathogenen Plasmodien aufweist, weshalb sie als Modellorganismus in vielen *in vivo*-Versuchen an Nagetieren genutzt werden [3]. Sie vollführen den für Plasmodien typischen Lebenszyklus mit Wirtswechsel von Stechmücken auf Säugetiere [10].

Die Vermehrung des Parasiten im Blut des Endwirtes führt zu den typischen Malaria-Symptomen wie veränderte Körpertemperatur, Gewichtsverlust, Blutarmut sowie der Schädigung von Leber, Lunge und Milz und in Folge dessen oft zum Tod [11, 4]. Außerhalb von Wirtstieren sind die Plasmodien nur unter definierten Kulturbedingungen lebensfähig [12].

Unterschiede zwischen den vier Nagetier-pathogenen Plasmodien finden sich beispielsweise in ihrer Morphologie, der Entwicklungsdauer, der Größe einzelner Entwicklungsstadien, der Präferenz für verschiedene Populationen roter Blutzellen und den Charakteristika der Sequestrierung, also der Anheftung infizierter Erythrozyten, die späte Entwicklungsstadien des

Parasiten enthalten, an die Endothelien des Wirtes. Diese Eigenschaften beeinflussen die Wirt-Parasiten-Interaktion, die Virulenz und die Pathogenität, weshalb der Infektionsverlauf in den vier Spezies mitunter verschiedenen ist [3]. Selbst verschiedene Isolate einer Spezies können Variationen aufweisen, die die Parasiten-Wirt-Interaktion beeinflussen, und auch die Genetik der Wirtstiere selbst besitzt einen signifikanten Einfluss [3, 13].

P. berghei

P. berghei wurde 1948 in Zentralafrika aus *A. dureni* isoliert und die Dickichtratte *Grammomys surdaster* als natürlicher Wirt beschrieben [14, 12]. Als Vektoren können experimentell neben der oft genutzten *A. stephensi* auch verschiedene andere *Anopheles*-Spezies wie z. B. *A. annupiles*, *A. atroparvus*, *A. freeborni*, *A. gambiae*, *A. maculipennis* und *A. quadrimaculatus* dienen [12].

P. berghei befällt murine Retikulozyten und weist eine asynchrone Entwicklung seiner Blutstadien auf. *P. berghei* befällt auch die Lunge und das Gehirn. Die Infektion im Nager verläuft i. d. R. letal [3].

P. chabaudi

P. chabaudi wurde zuerst 1965 beschrieben, nachdem es aus dem Blut einer Dickichtratte (*G. poensis*) in Zentralafrika isoliert wurde [13, 15].

P. chabaudi invadiert murine Erythrozyten und weist eine synchrone Entwicklung seiner Blutstadien auf. Im Wirtstier verläuft die Infektion i. d. R. nicht letal, sondern chronisch, wobei die Lunge nur mäßig befallen wird [3, 13]. Die konkreten Charakteristika der Pathogenität hängen stark vom jeweiligen Stamm ab [13].

P. yoelii

P. yoelii wurde zuerst 1966 beschrieben [13] und die Dickichtratte *G. poensis* als natürlicher Wirt identifiziert. Als experimentelle Vektoren sind Spezies des *A. culicifacies* Komplexes [16], *A. freeborni* [17], *A. gambiae* [18], *A. quadrimaculatus* [19], *A. stephensi* [20] sowie *A. minimus*, *A. soperi* und *A. sinensis* [21] beschrieben.

P. yoelii invadiert murine Retikulozyten, wobei sich seine Blutstadien asynchron entwickeln. Im Wirtstier verläuft die natürliche Infektion i. d. R. letal, experimentell ist die Virulenz abhängig von der verwendeten Mausspezies und dem Stamm von *P. yoelii*. Die Lungenpathogenität von *P. yoelii* ist begrenzt [3].

P. vinckei

P. vinckei wurde 1952 aus *A. dureni* isoliert [13] und die Dickichtratte *G. poensis* als natürlicher Wirt beschrieben. Als experimentelle Vektoren sind auch Spezies des *A. culicifacies* Komplexes beschrieben [16].

P. vinckei weist eine Präferenz für murine Erythrozyten auf. Die Entwicklung der Blutstadien erfolgt synchron. Die Infektion verläuft i. d. R. letal mit zum Teil ausgeprägter Lungenpathologie (abhängig von der Mausspezies) [3].

P. berghei, *P. chabaudi*, *P. yoelii* und *P. vinckei* werden in den Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe 464 „Einstufung von Parasiten“ der Risikogruppe 1 mit dem Zusatz t2 zugeordnet¹ [22].

Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien im Anhang I GenTSV werden *Plasmodium berghei*, *Plasmodium chabaudi*, *Plasmodium yoelii* und *Plasmodium vinckei* als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 2** zugeordnet.

Werden gentechnische Arbeiten mit *P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. yoelii* und *P. vinckei* ohne Überträgerorganismen bzw. mit nicht-infektiösen Lebensstadien der Parasiten durchgeführt, können die gentechnischen Arbeiten der **Sicherheitsstufe 1** zugeordnet werden.

Begründung

Es handelt sich um tierpathogene Erreger, deren Wirtsbereich sich auf murine Nagetiere begrenzt und die vektorbasiert übertragen werden. Eine Infektion des Menschen ist bisher nicht beschrieben und ist aufgrund des engen Wirtsbereiches auch nicht zu erwarten.

Die Übertragung erfolgt natürlicherweise über Mücken, die bisher nicht in Deutschland verbreitet sind [23]. Einzelne Mückenspezies, die experimentell mit einem Nagetier-Plasmodium infiziert werden können, sind bereits in Deutschland verbreitet.

Eine direkte Übertragung zwischen Nagetieren erfolgt nicht. Eine Verbreitung der Plasmodien außerhalb der gentechnischen Anlage ist ausgeschlossen, solange keine infizierten Mäuse aus der gentechnischen Anlage entweichen und/oder keine Mücken, in denen sich die Plasmodien vermehren können, in das Labor gelangen können. Unter Heranziehung des Index „d“ der Liste der Spender- und Empfängerorganismen nach § 5 GenTSV können daher gentechnische Arbeiten, die ohne Überträger oder infektiöse Stadien durchgeführt werden, unter Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 1 durchgeführt werden. Bei diesen gentechnischen Arbeiten sind folgende Vorgaben einzuhalten:

- Die gentechnische Anlage ist so auszustatten, dass ein Ein- bzw. Ausflug von Mücken verhindert wird (z. B. durch einen Mückenschutz).
- Im Labor sind Mittel zum Abtöten von Mücken bereitzustellen (ggf. Fliegenklatsche, Insektenspray).
- Die Versuchstiere sind durch geeignete Maßnahmen an der Flucht zu hindern (z. B. Aufstellen von Fallen).

Literatur

1. **Boundenga L, Ngoubangoye B, Ntie S, Moukodoum N-D, Renaud F, Rougeron V, Prugnolle F** (2019). Rodent malaria in Gabon: Diversity and host range. *Int J Parasitol Parasites Wildl* **10**:117–24.
2. **Boonpucknavig V, Boonpucknavig S, Bhamarapravati N** (1973). *Plasmodium berghei* Infection in Mice. *Am J Clin Pathol* **70**(1):89–100.
3. **Niz M de, Heussler VT** (2018). Rodent malaria models: insights into human disease and parasite biology. *Curr Opin Microbiol* **46**:93–101. doi:10.1016/j.mib.2018.09.003.

¹ „Wegen der Wirbeltierpathogenität können aus tierseuchenrechtlicher Sicht Schutzmaßnahmen erforderlich werden, die vergleichbar mit den Schutzmaßnahmen der Schutzstufe 2 ein Entweichen des Parasiten in die äußere Umgebung bzw. in andere Arbeitsbereiche minimieren.“

4. **Junaid QO, Khaw LT, Mahmud R, Ong KC, Lau YL, Borade PU, Liew JWK, Sivanandam S, Wong KT, Vythilingam I** (2017). Pathogénèse de l'infection par *Plasmodium berghei* ANKA chez la gerbille (*Meriones unguiculatus*) comme modèle expérimental pour le paludisme sévère. *Parasite* **24**:38.
5. **Poudel SS, Newman RA, Vaughan JA** (2008). Rodent plasmodium: population dynamics of early sporogony within *Anopheles stephensi* mosquitoes. *J Parasitol* **94**(5):999–1008.
6. **Carlton JM, Angiuoli SV, Suh BB, Kooij TW, Perteau M, Silva JC, Ermolaeva MD, Allen JE, Selengut JD, Koo HL, Peterson JD, Pop M, Kosack DS, Shumway MF, Bidwell SL, Shallom SJ, van Aken SE, Riedmuller SB, Feldblyum TV, Cho JK, Quackenbush J, Sedegah M, Shoabi A, Cummings LM, Florens L, Yates JR, Raine JD, Sinden RE, Harris MA, Cunningham DA, Preiser PR, Bergman LW, Vaidya AB, van Lin LH, Janse CJ, Waters AP, Smith HO, White OR, Salzberg SL, Venter JC, Fraser CM, Hoffman SL, Gardner MJ, Carucci DJ** (2002). Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature* **419**(6906):512–9.
7. **Hall N, Karras M, Raine JD, Carlton JM, Kooij TWA, Berriman M, Florens L, Janssen CS, Pain A, Christophides GK, James K, Rutherford K, Harris B, Harris D, Churcher C, Quail MA, Ormond D, Doggett J, Trueman HE, Mendoza J, Bidwell SL, Rajandream M-A, Carucci DJ, Yates JR, Kafatos FC, Janse CJ, Barrell B, Turner CMR, Waters AP, Sinden RE** (2005). A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science* **307**(5706):82–6.
8. **Otto TD, Böhme U, Jackson AP, Hunt M, Franke-Fayard B, Hoeijmakers WAM, Religa AA, Robertson L, Sanders M, Ogun SA, Cunningham D, Erhart A, Billker O, Khan SM, Stunnenberg HG, Langhorne J, Holder AA, Waters AP, Newbold CI, Pain A, Berriman M, Janse CJ** (2014). A comprehensive evaluation of rodent malaria parasite genomes and gene expression. *BMC Biol* **12**(1):1–18.
9. **Ramaprasad A, Klaus S, Douvropoulou O, Culleton R, Pain A** (2020). *Plasmodium vinckei* genomes provide insights into the pan-genome and evolution of rodent malaria parasites. *bioRxiv*(Preprint). doi:10.1101/2020.09.07.286369.
10. **Siciliano G, Alano P** (2015). Enlightening the malaria parasite life cycle: bioluminescent *Plasmodium* in fundamental and applied research. *Front Microbiol* **6**:391.
11. **Basir R, Rahiman SSF, Hasballah K, Chong WC, Talib H, Yam MF, Jabbarzare M, Tie TH, Othman F, Moklas MAM, Abdullah WO, Ahmad Z** (2012). *Plasmodium berghei* ANKA Infection in ICR Mice as a Model of Cerebral Malaria. *Iranian J Parasitol* **7**(4):62–74.
12. **Xu J, Hillyer JF, Coulibaly B, Sacko M, Dao A, Niaré O, Riehle MM, Traoré SF, Vernick KD** (2013). Wild *Anopheles funestus* mosquito genotypes are permissive for infection with the rodent malaria parasite, *Plasmodium berghei*. *PLoS one* **8**(4):e61181.
13. **Stephens R, Culleton RL, Lamb TJ** (2012). The contribution of *Plasmodium chabaudi* to our understanding of malaria. *Trends Parasitol* **28**(2):73–82.
14. **Conteh S, Anderson C, Lambert L, Orr-Gonzalez S, Herrod J, Robbins YL, Carter D, Karhemere SBS, Pyana P, Büscher P, Duffy PE** (2017). *Grammomys surdaster*, the Natural Host for *Plasmodium berghei* Parasites, as a Model to Study Whole-Organism Vaccines Against Malaria. *Am J Trop Med Hyg* **96**(4):835–41.
15. **Landau I** (1965). Description of *Plasmodium chabaudi* N. Sp. Parasite of African Rodents. *C R Hebd Seances Acad Sci*(260):3758–61.
16. **Kaur S, Singh OP, Adak T** (2000). Susceptibility of Species A, B, and C of *Anopheles culicifacies* Complex to *Plasmodium yoelii yoelii* and *Plasmodium vinckei petteri* Infections. *J Parasitol* **86**(6):1345–8.
17. **Vaughan JA, Hensley L, Beier JC** (1994). Sporogonic Development of *Plasmodium yoelii* in Five Anopheline Species. *J Parasitol* **80**(5):674–81.
18. **Voordouw MJ, Anholt BR, Taylor PJ, Hurd H** (2009). Rodent malaria-resistant strains of the mosquito, *Anopheles gambiae* have slower population growth than -susceptible strains. *BMC Evol Biol* **9**(1):1–14.
19. **Wing SR, Young MD, Mitchell SE, Seawright JA** (1985). Comparative susceptibilities of *Anopheles quadrimaculatus* mutants to *Plasmodium yoelii*. *J Am Mosq Control Assoc* **1**(4):511–3.

20. **Mendis KN, Targett GA** (1982). Vaccination to prevent transmission of *Plasmodium yoelii* malaria. *Parasite Immunol* **4**(2):117–27.
21. **Toma T, Miyagi I, Tamashiro M, Tsuzuki A** (2002). Susceptibility of the mosquitoes *Anopheles minimus*, *An. sinensis*, and *An. soperi* (Diptera: *Culicidae*) from the Ryukyu Archipelago, Japan, to the rodent malaria *Plasmodium yoelii nigeriense*. *J Med Entomol* **39**(1).
22. **TRBA** (2013). Einstufung von Parasiten in Risikogruppen (TRBA 464). <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-464.html>. Besucht am 04.09.2020.
23. **Werner D, Kowalczyk S, Kampen H** (2020). Nine years of mosquito monitoring in Germany, 2011-2019, with an updated inventory of German culicid species. *Parasitol Res* **119**(9):2765–74.