

Empfehlung der ZKBS zur Risikobewertung von
Trypanosoma brucei gambiense
und *Trypanosoma brucei rhodesiense*
als Spender- oder Empfängerorganismen
gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV

Allgemeines

Die Gattung *Trypanosoma* (Klasse der Kinetoplastida), umfasst einzellige Flagellaten, die als Parasiten bei verschiedensten Wirbeltieren, von Fischen bis zu Säugetieren, vorkommen, wobei nur wenige Arten den Menschen infizieren [1].

T. brucei umfasst drei Unterarten: Die tierpathogene Subspezies *Trypanosoma brucei brucei* sowie die humanpathogenen Subspezies *Trypanosoma brucei gambiense* (Gruppe 1 und Gruppe 2) [2] und *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Bei *T. b. brucei* handelt es sich um einen diploiden Organismus mit einem 26 Mbp großen Genom. Neben 11 klassischen Chromosomen liegen intermediäre und Mini-Chromosomen vor, die für die *variable surface glycoproteins* (VSG) kodieren [3, 4].

Die Übertragung erfolgt hauptsächlich durch den Stich von infizierten Fliegen der Gattung *Glossina*, bekannt als Tsetsefliegen. Neben dem Hauptübertragungsweg durch die Tsetsefliege wurden auch Infektionen durch Sexualkontakte oder kontaminierte Blutprodukte, orale Übertragungen sowie mechanische Übertragungen durch blutsaugende Organismen, Nadelstichverletzungen und medizinisches Besteck beschrieben [5, 14]. Alle drei Unterarten von *Trypanosoma brucei* kommen natürlicherweise ausschließlich in Afrika, südlich der Sahara im Verbreitungsgebiet der Tsetsefliegen, dem sogenannten Tsetsegürtel, vor.

T. b. brucei löst in Rindern, Schweinen und Kamelen, aber auch in Wildtieren, die als natürliches Reservoir dienen, die Nagana-Krankheit aus; der Mensch wird i.d.R. von dieser Trypanosomen-Unterart nicht infiziert. Im Gegensatz dazu können *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense* neben Tieren auch den Menschen infizieren und die Afrikanische Schlafkrankheit hervorrufen (*Human African Trypanosomiasis*, HAT) [1, 5]. Die Infektion geht mit einer exzessiven Immundysfunktion und Immunpathologie einher, die durch eine anhaltende entzündliche Immunreaktion des Wirtes entstehen [1]. Nach einer initialen hämolymphatischen Phase, mit Symptomen von starken Kopfschmerzen, Lymphknotenschwellungen (Winterbottom-Zeichen), Schlaflosigkeit und Ausschlag, dringt der Parasit über den Blutstrom in das zentrale Nervensystem ein und führt in der meningoenzephalitischen Phase zu fortschreitenden neurologischen Störungen. Ohne Therapie führt dies in nahezu 100 % der Fälle zum Tod [5]. Bei *T. b. gambiense* kann eine Erkrankung um Monate und Jahre verlaufen; bei *T. b. rhodesiense* ist der Verlauf akuter (unter neun Monate).

Die extrazellulär lebenden Parasiten ernähren sich durch Endozytose von Bestandteilen der Körperflüssigkeiten des Wirtes. Der Lebenszyklus ist komplex und umfasst verschiedene pleomorphe Lebensformen in den jeweiligen Wirtstieren: Bei dem Stich einer infizierten

Tsetsefliege gelangen mit dem Speichel metazyklische, nicht-replikative, infektiöse, trypomastigote Parasiten ins Gewebe des Säugetierwirtes, wo sie sich im Zellzwischenraum zu schlanken Trypomastigoten umwandeln und vermehren. Von dort gelangen die Zellen auch in die Blutbahn. Im weiteren Verlauf der Infektion wandeln sich die Zellen in kurze, gedrungene Trypomastigoten um, die infektiös für Tsetsefliegen sind. Beim Stich eines infizierten Säugetiers nimmt die Tsetsefliege mit dem Blut Parasitenzellen auf. Diese wandeln sich im Mitteldarm der Fliege zu prozyklischen, replikativen Trypomastigoten um. Die prozyklischen Trypomastigoten vermehren sich im Darm der Fliege, wandeln sich zu Epimastigoten um und wandern in die Speicheldrüse, wo sie sich weiter vermehren. Dort entstehen schließlich aus den Epimastigoten neue metazyklische, trypomastigote Zellen, die infektiös für den Säugetierwirt sind. Der Vermehrungszyklus in der Fliege dauert etwa drei Wochen [1].

Die Interaktion zwischen Wirt und Parasit ist sehr komplex. Durch einen häufigen Wechsel der Expression von mehr als 100 verschiedenen VSG-Genen verändert der Parasit seine Zelloberfläche periodisch und entkommt so der spezifischen Immunantwort des Immunsystems des Wirtes, die zu einer Komplement-vermittelten Lyse des Parasites führen würde [5, 6].

Verantwortlich für die natürliche Resistenz des Menschen gegen die ausschließlich tierpathogenen Trypanosomen sind die *trypanosome lytic factors 1* und 2 (TLF1 und TLF2) des humanen Serums, die u. a. das *haptoglobin related protein* (HPR) und Apolipoprotein L1 (ApoL1) enthalten [1]. Der Lipoprotein-Komplex bindet den *haptoglobin/hemoglobin*-Rezeptor auf der Oberfläche der Trypanosomen und wird durch Endozytose aufgenommen. ApoL1 bildet daraufhin Poren in den Lysosomen- und Mitochondrienmembranen der Trypanosomen, was zu ihrer Lyse führt [7].

Die drei *T. brucei*-Unterarten unterscheiden sich zwar nicht morphologisch, aber in ihrer Ausstattung mit Virulenz-assoziierten Faktoren, die die Wirtsspezifität und den Infektionsverlauf bestimmen. Im Gegensatz zu *T. b. brucei* exprimieren *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense* Proteine, die TLF1 und TLF2 hemmen. In *T. b. rhodesiense* liegt das *serum resistance associated* (SRA)-Gen vor, welches für ein verkürztes VSG kodiert. Dieses bindet ApoL1 und verhindert durch seine Neutralisierung die Lyse [8]. Im Genom von *T. b. gambiense* liegt kein SRA-Gen vor. *T. b. gambiense* nutzt verschiedene Mechanismen, die eine Resistenz gegen die Lyse verleihen [2]. Die Resistenz der *T. b. gambiense* der Gruppe 1 beruht auf einer Punktmutation im TLF1-Rezeptor sowie einer verringerten Expression des Rezeptors, so dass die Aufnahme von TLF1 reduziert ist. Außerdem liegt das *T. b. gambiense-specific glycoprotein* (TgsGP) vor, ein Rezeptor-ähnliches, verkürztes VSG, welches die Membranfluidität reduziert und somit die Lyse verhindert. Eine erhöhte Aktivität von Cystein-Proteasen in der Verdauungsvakuole des Parasiten beschleunigt zudem den Abbau von ApoL [9–11]. Die Resistenz der *T. b. gambiense* der Gruppe 2 ist auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen, die noch weitestgehend unerforscht sind. Es wurden jedoch zu TgsGP ähnliche Gene identifiziert [2].

T. b. rhodesiense führt i. d. R. zu einer akut verlaufenden HAT, an der die Patienten oft innerhalb weniger Monate sterben [12]. Rinder und Wildtiere, wie z. B. Antilopen, sind das Hauptreservoir. In diesen wird durch *T. b. rhodesiense* die Nagana-Krankheit ausgelöst [13]. Infektionen mit *T. b. gambiense* sind hingegen durch eine lange Latenz und chronischen Verlauf über mehrere Jahre gekennzeichnet [14]. *T. b. gambiense* ist für mehr als 97 % der humanen Trypanosomen-Infektionen verantwortlich. Der Mensch gilt als Hauptreservoir. Unbehandelt endet die Infektion in den meisten Fällen tödlich [15]. Die bestehenden Therapien sind aufgrund ihrer Toxizität bzw. mangelnder ZNS (Zentrales Nervensystem)-Gängigkeit unbefriedigend [16]. Für *T. b. rhodesiense* und *T. b. gambiense* gibt es weder eine effektive Impfung noch eine medikamentöse Prophylaxe.

Gemäß des Anhangs II der Richtlinie 2000/54/EG über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit vom 18. September 2000 wird *T. b. rhodesiense* in die Risikogruppe 3** und *T. b. gambiense* in die Risikogruppe 2 eingestuft. In den Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe 464 Einstufung von Parasiten werden sowohl *T. b. gambiense* als auch *T. b. rhodesiense* der Risikogruppe 3** zugeordnet, mit dem Hinweis, dass „bei Tätigkeiten mit epimastigoten Formen in der Kultur und trypomastigoten Formen im Wirbeltierwirt [...] die Schutzmaßnahmen der Schutzstufe 2 zusammen mit den in Anhang 1 der TRBA 100 aufgeführten zusätzlichen Maßnahmen anzuwenden [sind]“ [17].

Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien im Anhang I GenTSV werden *Trypanosoma brucei gambiense* und *Trypanosoma brucei rhodesiense* als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 3**** zugeordnet.

Gentechnische Arbeiten mit *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense* als Spender- und/oder Empfängerorganismus sind in der Sicherheitsstufe 3 durchzuführen, sofern mit Überträgern, in diesem Fall blutsaugenden Insekten, oder infektiösen Stadien des Parasiten gearbeitet wird. Bei gentechnischen Arbeiten ohne Überträger/Zwischenwirt bzw. ohne infektiöse Stadien des Parasiten kann die Einstufung in die Sicherheitsstufe 2 erfolgen, sofern keine Nukleinsäureabschnitte übertragen werden, die das Gefährdungspotenzial der o. g. Empfängerorganismen erhöhen.

Begründung

Infektionen mit *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense* verlaufen unbehandelt sowohl für den Menschen als auch für suszeptible Tiere in nahezu allen Fällen tödlich. Eine Impfung oder Prophylaxe ist nicht verfügbar. Die Übertragung ist auch auf mechanischem Wege, beispielsweise durch eine akzidentielle Selbstinokulation, möglich. *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense* unterscheiden sich lediglich in der Art der Resistenz gegenüber humanem Serum und im Zeitfenster, in dem die Infektion zum Tod führt.

Die Parasiten weisen einen komplexen Lebenszyklus mit verschiedenen Parasitenstadien auf. In Analogie zur Stellungnahme der ZKBS zur „Einstufung der Parasiten *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum* und *Trypanosoma brucei rhodesiense* als Empfängerorganismen bei gentechnischen Arbeiten“ (Az. 6790-10-70, Juni 2001) kann die Einstufung daher differenziert erfolgen. Maßgeblich ist dabei, ob ein infektiöses Stadium des Parasiten vorliegt oder nicht.

Literatur

1. **Radwanska M, Vereecke N, Deleeuw V, Pinto J, Magez S** (2018). Salivarian Trypanosomosis: A Review of Parasites Involved, Their Global Distribution and Their Interaction With the Innate and Adaptive Mammalian Host Immune System. *Front Immunol* **9**:2253.
2. **Jamonneau V, Truc P, Grébaud P, Herder S, Ravel S, Solano P, Meeus T de** (in press). *Trypanosoma brucei gambiense* Group 2: The Unusual Suspect. *Trends Parasitol.* E-Pub ahead of print 24.10.2019.
3. **Achcar F, Kerkhoven EJ, Barrett MP** (2014). *Trypanosoma brucei*: meet the system. *Curr Opin Microbiol* **20**:162–9.

4. **Rudenko G** (2011). African trypanosomes: the genome and adaptations for immune evasion. *Essays Biochem* **51**:47–62.
5. **Ponte-Sucre A** (2016). An Overview of *Trypanosoma brucei* Infections: An Intense Host-Parasite Interaction. *Front Microbiol* **7**:2126.
6. **Glover L, Hutchinson S, Alsford S, McCulloch R, Field MC, Horn D** (2013). Antigenic variation in African trypanosomes: the importance of chromosomal and nuclear context in VSG expression control. *Cell Microbiol* **15**(12):1984–93.
7. **Vanwalleghem G, Fontaine F, Lecordier L, Tebabi P, Klewe K, Nolan DP, Yamaryo-Botté Y, Botté C, Kremer A, Burkard GS, Rassow J, Roditi I, Pérez-Morga D, Pays E** (2015). Coupling of lysosomal and mitochondrial membrane permeabilization in trypanolysis by APOL1. *Nat Commun* **6**:8078.
8. **Stephens NA, Kieft R, Macleod A, Hajduk SL** (2012). Trypanosome resistance to human innate immunity: targeting Achilles' heel. *Trends Parasitol* **28**(12):539–45.
9. **Capewell P, Clucas C, DeJesus E, Kieft R, Hajduk S, Veitch N, Steketee PC, Cooper A, Weir W, Macleod A** (2013). The TgsGP Gene Is Essential for Resistance to Human Serum in *Trypanosoma brucei gambiense*. *PLoS Pathog* **9**(10).
10. **Capewell P, Cooper A, Clucas C, Weir W, Macleod A** (2015). A co-evolutionary arms race: trypanosomes shaping the human genome, humans shaping the trypanosome genome. *Parasitology* **142** Suppl **1**:S108-19.
11. **Uzureau P, Uzureau S, Lecordier L, Fontaine F, Tebabi P, Homblé F, Grélard A, Zhendre V, Nolan DP, Lins L, Crowet J-M, Pays A, Felu C, Poelvoorde P, Vanhollebeke B, Moestrup SK, Lyngsø J, Pedersen JS, Mottram JC, Dufourc EJ, Pérez-Morga D, Pays E** (2013). Mechanism of *Trypanosoma brucei gambiense* resistance to human serum. *Nature* **501**(7467):430–4.
12. **Barrett MP, Burchmore RJS, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, Krishna S** (2003). The trypanosomiasis. *The Lancet* **362**(9394):1469–80.
13. **Cooper C, Clode PL, Peacock C, Thompson RCA** (2017). Chapter Two - Host-Parasite Relationships and Life Histories of Trypanosomes in Australia . p. 47–109. In Rollinson D, Stothard JR (ed), *Advances in Parasitology*, vol. 97. Academic Press, London.
14. **Franco JR, Simarro PP, Diarra A, Jannin JG** (2014). Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clin Epidemiol* **6**:257–75.
15. **WHO** (2019). Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness)). Besucht am 18. November 2019.
16. **Gehrig S, Efferth T** (2008). Development of drug resistance in *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *Trypanosoma brucei gambiense*. Treatment of human African trypanosomiasis with natural products (Review). *Int J Mol Med* **22**(4):411–9.
17. **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 5. September 2019.