

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Kristýna Klára Novotná

Pokroky v terapii lidské trypanosomiázy
Advances in treatment of human trypanosomiasis

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Jan Mach

Praha, 2014

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala svému školiteli Mgr. Janu Machovi za výjimečné nasazení, ochotu, vstřícnost a dobré rady během psaní a úprav mé bakalářské práce. Dále chci poděkovat své mamince a příteli za podporu.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 14. května 2014

Kristýna Klára Novotná

Abstrakt

Spavá nemoc je lidské onemocnění vyskytující se v subsaharské Africe, které je způsobené parazitickým prvokem *Trypanosoma brucei*. Druh *Trypanosoma brucei* napadá různé savce, ovšem pouze poddruhy *Trypanosoma brucei gambiense* a *Trypanosoma brucei rhodesiense* jsou resistantní vůči tzv. trypanolytickým faktorům obsažených v lidském krevním séru. V této práci jsou stručně shrnuty známé mechanismy působení trypanolytických faktorů a mechanismy rezistence trypanosom vůči těmto faktorům. Práce je zaměřena především na popis a shrnutí současných metod diagnostiky spavé nemoci a používaných trypanocidních léků. Většina představených diagnostických metod vykazuje vysokou míru senzitivity a specifity, ale je pro chudé, nemocí postižené oblasti, často příliš drahá. Používané léky jsou rovněž drahé, navíc některé neúčinkují na oba poddruhy a mají vážné vedlejší účinky. Poslední část práce se věnuje potencionálnímu vývinu nových léčiv.

Klíčová slova: trypanosoma, trypanosomiáza, trypanolytický faktor, léčba, diagnostika

Abstract

Sleeping sickness is a human disease found in sub-saharan Africa, and is caused by a parasitic protozoan *Trypanosoma brucei*. *Trypanosoma brucei* species infects various mammals, however, only *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei rhodesiense* subspecies are resistant to trypanolytic factors found in human blood serum. This work briefly summarizes known operating mechanisms of trypanolytic factors and resistance mechanisms of trypanosomes to these factors. The work covers mainly description and summarization of current diagnostic methods of sleeping sickness and used trypanocidal drugs. Majority of introduced methods shows high levels of sensitivity and specificity, however, for poor, disease affected areas they are often way too expensive. Prescribed drugs are expensive as well, and what's more, they are often ineffective against both subspecies and have severe side effects. Last part of the work is dedicated to potential development of new medicaments.

Key words: trypanosome, trypanosomiasis, trypanolytic factor, treatment, diagnostics

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Trypanolytický faktor.....	4
2.1 Charakteristika trypanolytického faktoru.....	4
2.2 Mechanismus působení trypanolytického faktoru.....	4
2.3 Rezistence.....	4
2.3.1 Trypanosoma brucei rhodesiense.....	5
2.3.2 Trypanosoma brucei gambiense.....	5
3 Diagnostické metody.....	6
3.1 Trypanosoma brucei gambiense.....	6
3.1.1 Nepřímá diagnostika.....	6
3.1.1.1 Klinické znaky a symptomy.....	7
3.1.1.2 Krevní obraz.....	7
3.1.1.3 Sérologické metody.....	7
3.1.1.4 Detekce DNA pomocí PCR.....	10
3.1.2 Přímá diagnostika.....	10
3.1.2.1 Přímý mikroskopický průkaz.....	10
3.1.2.2 Centrifugační metody.....	12
3.1.2.3 KIVI (Kit for in vitro isolation of trypanosomes).....	13
3.1.2.4 In vivo inokulace.....	13
3.1.3 Efektivita diagnostických metod.....	14
3.2 Trypanosoma brucei rhodesiense.....	15
3.2.1 Přímá diagnostika.....	15
3.2.2 Nepřímá diagnostika.....	15
4 Léčba.....	16
4.1 I. fáze.....	17
4.1.1 Pentamidin.....	17
4.1.2 Berenil.....	18
4.1.3 Suramin.....	19
4.2 II. fáze.....	20
4.2.1 Melarsoprol.....	20
4.2.2 Eflornithin.....	22
4.2.3 Nifurtimox.....	23
4.3 Kombinace léků.....	24
4.4 Relaps onemocnění.....	25
4.5 Efektivita trypanocidních léků (souhrn).....	25
4.6 Vývoj nových léků.....	26
4.6.1 DB289 - Puframidin maleát.....	26
4.6.2 Benzoxaborol.....	26
4.6.3 Azadipeptidové nitrily.....	26
4.6.4 Trypanocidní aktivita přírodních látek.....	27
4.7 Vakcinace.....	27
5 Závěr.....	28
6 Literatura.....	29

1 Úvod

Lidská africká trypanosomiáza (spavá nemoc) je způsobena 2 parazitickými původci: *Trypanosoma brucei gambiense* a *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *T. b. gambiense* je antroponóza, vyvolává lehčí průběh onemocnění a stojí za většinou případů spavé nemoci (Malvy a Chappuis 2011). *T. b. rhodesiense* má sice nižší incidenci, ale způsobuje akutnější formu onemocnění, je to zoonóza.

Obě trypanosomy se vyskytují v subsaharské Africe, přičemž *T. b. gambiense* v centrální a západní a *T. b. rhodesiense* v jižní a východní Africe.

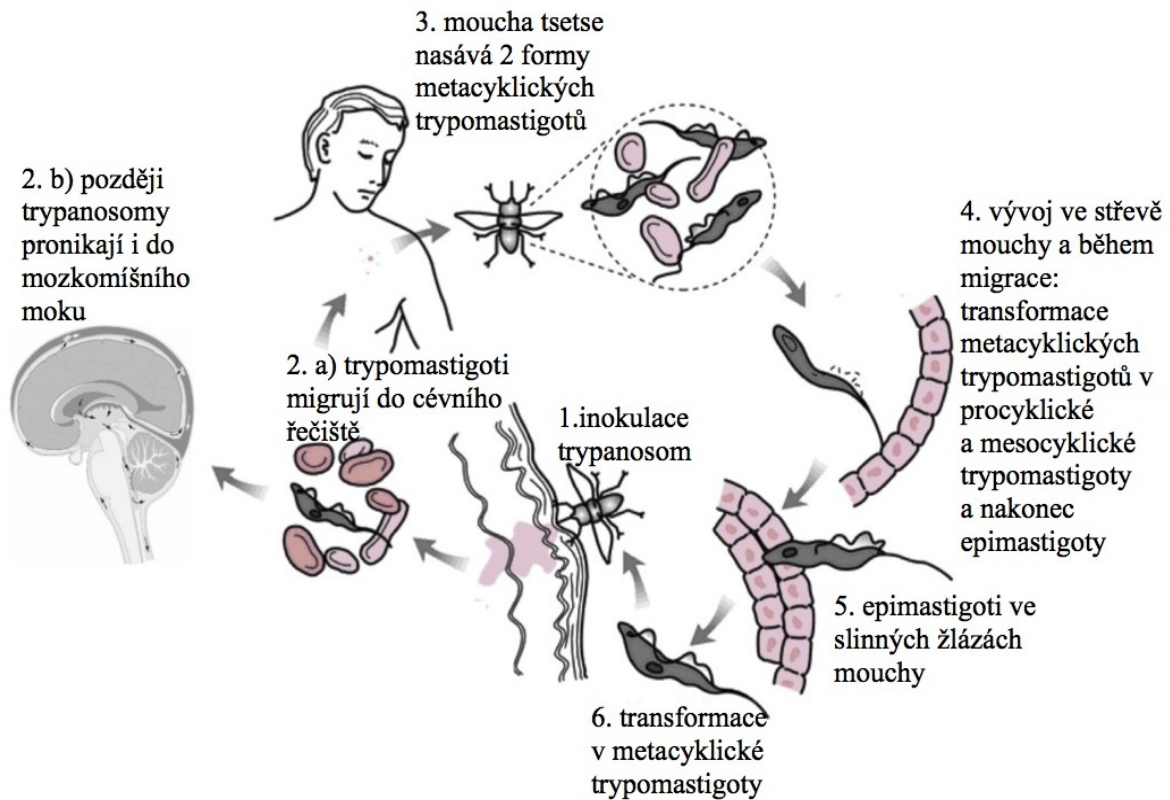
Toto geografické rozdělení je v Ugandě postupně stíráno a reálně hrozí překrytí regionů, kde se obě trypanosomy vyskytují (Picozzi *et al.* 2005).

Trypanosomy prodělávají složitý životní cyklus (viz obr. 1), jehož nezbytnou součástí je maturace ve vektorech: krevsajících mouchách tsetse rodu *Glossina* (spp.). V průběhu cyklu se trypanosomy postupně transformují do několika forem.

Průběh samotné infekce je zahájen reakcí imunitního systému hostitele proti povrchovým variabilním glykoproteinům trypanosom (Malvy a Chappuis 2011). Dochází k produkci protilátek tříd IgG a především IgM. Díky specifickým protilátkám je zničena většina trypanosom. U jisté části populace, ale mezitím dochází k syntéze nové formy povrchových variabilních glykoproteinů nerozpoznávaných současnými protilátkami a proliferaci této generace, dokud nejsou vytvořeny nové specifické protilátky. Tento děj se v průběhu nemoci cyklicky opakuje a imunitní systém proto není schopen se s parazity vypořádat (Brun *et al.* 2010; Malvy a Chappuis 2011). Právě kvůli značné variabilitě antigenních povrchových struktur, je vývoj vakcíny velmi komplikovaný.

Podle stupně invaze do hostitelského organismu, můžeme průběh onemocnění rozdělit na 2 fáze: první stadium, tzv. hemolymfatické (lymfá, krev) a druhé stadium, tzv. meningocefalické (mozkomíšní mok) (Brun *et al.* 2010).

Trypanosomy způsobující lidskou trypanosomiázu vykazují, na rozdíl od *Trypanosoma brucei brucei* (která je pro člověka nepatogenní), jednu důležitou vlastnost: rezistenci vůči trypanosomovému lytickému faktoru (Vanhamme a Pays 2004). Hlavní složkou tohoto faktoru je zřejmě apolipoprotein L-I, který je součástí High Density Lipoproteins (HDLs) obsažených standardně v lidském séru.



Obr. 1: Životní cyklus afrických trypanosom (upraveno podle Mahon a Manuselis 2000)

- 1) Trypanosomy jsou do člověka inokulovány během sání mouchy tsetse společně s jejími slinami (Chappuis *et al.* 2005). V místě inokulace se trypanosomy, před invazí do cévního a lymfatického řečiště, množí a vzniká tzv. šankr, což je edém způsobený lokálním zánětem.
- 2) a) Trypanosomy poté ze šankru migrují do lymfatického a cévního systému.
b) V pozdější fázi onemocnění pronikají i do mozkomíšního moku.
- 3) Po dostatečném pomnožení v hostiteli jsou trypanosomy znovu nasáty mouchou tsetse. V tělních tekutinách člověka se vyskytují dvě formy metacyklických trypomastigotů s rozdílnou morfologií a vlastnostmi: podlouhlá, štíhlá, proliferující forma, tzv. „slender“ a mohutnější, krátká, nedělící se forma, tzv. „stumpy“ forma. Obě formy jsou nasáty mouchou, ale pouze stumpy forma je schopna ve střevě mouchy tsetse přežít a dále se vyvíjet (Turner *et al.* 1988). Ve střevě mouchy je v počáteční fázi vývoje zahubeno více než 99% nasátých trypanosom (Van den Abbeele *et al.* 1999).
- 4) Maturace v mouše začíná diferenciací metacyklických trypomastigotů v trypomastigoty procyklické. Procykličtí trypomastigoti se množí v ektoperitrofickém prostoru zadního a posléze i předního střeva, kde se mění v mesocyklické trypomastigoty. Ti migrují do proventricula, předního střeva a osáku.
- 5) V chobotu se mesocykličtí trypomastigoti mění v epimastigoty, kteří se dále dostávají přes hypofarynx do slinných žláz.
- 6) Epimastigoti se nakonec mění v metacyklické trypomastigoty a mohou být znovu inokulováni.

Incidence spavé nemoci prošla, v konsekvencích historických souvislostí, zajímavým vývojem. Na počátku 20. století byl africký kontinent trypanosomiázou mohutně zasažen (Simarro *et al.* 2008). Během koloniální správy došlo díky systematické kontrole k téměř úplnému vymýcení nemoci (1930-1960). S aktem vyhlášení nezávislosti se ovšem do popředí dostaly jiné problémy a nemoci začalo opět plíživě přibývat. Nakonec vedla další vlna opatření (po zásahu WHO) k postupnému snížení incidence a mezi lety 1997-2006 došlo k redukci počtu nových případů *T. b. gambiense* o 69% (11382 případů) (Simarro *et al.* 2008; Simarro

et al. 2013). V roce 2011 bylo hlášeno 6631 nových případů *T. b. gambiense* (Simarro *et al.* 2013). Onemocnění způsobené *T. b. gambiense* ohrožuje přibližně 57,54 milionu lidí (Simarro *et al.* 2012).

U *T. b. rhodesiense* nejprve nedocházelo ke znatelnému snížení incidence (Simarro *et al.* 2008). Roli mohl hrát větší vliv zvířecích rezervoárů na přenos nemoci (na rozdíl od *T. b. gambiense*) než mu přikládala kontrolní opatření. V posledních letech se zdá být situace stabilizovanější a v roce 2011 bylo hlášeno pouhých 111 případů onemocnění způsobených *T. b. rhodesiense* (Simarro *et al.* 2013). V riziku je však 12,46 milionu lidí (Simarro *et al.* 2012).

I přes viditelné snížení počtu případů (hlavně u *T. b. gambiense*), je promořenost trypanosomiázou v subsaharské Africe stále vysoká, a navíc je pravděpodobné, že jsou dostupné statistiky znatelně podhodnoceny, neboť nemoc se vyskytuje především v chudých a odlehlých oblastech s nedostatečnou zdravotní péčí (mnoho případů tak zůstává nediodagnostikováno) (Brun *et al.* 2010).

Ve své práci chci popsat dosud známé mechanismy působení trypanolytického faktoru a rezistence trypanosom vůči faktoru. Jako další cíl své bakalářské práce si kladu analýzu současné diagnostiky a léčby trypanosomiázy a popsání jejich dalšího možného vývoje, přesněji charakteristiku současných diagnostických metod, používaných léků a jejich mechanismy působení, vývoj a možnosti nových metodik a výzkum a zacílení nových léčiv.

2 Trypanolytický faktor

Většina druhů trypanosom by při průniku do člověka byla zahubena cytotoxickým faktorem obsaženým v lidském séru, tzv. trypanolytickým faktorem. Výjimkou jsou dva lidské patogenní druhy: *T. b. gambiense* a *T. b. rhodesiense*, které jsou vůči tomuto faktoru rezistentní. Trypanosomy tak dokážou obcházet jak adaptivní imunitu (syntézou VSG), tak imunitu vrozenou (rezistencí k trypanolytickému faktoru) (Vanhollebeke *et al.* 2008).

2.1 Charakteristika trypanolytického faktoru

Identifikaci trypanolytické složky lidského séra provedl jako první Rifkin v roce 1978. Podle něj byla cytotoxická složka séra součástí high density lipoproteins (HDLs). Později bylo zjištěno, že s HDLs je spjatý pouze jeden z faktorů, tzv. TLF1 (trypanolytický faktor 1) a byl objeven další faktor: TLF2.

TLF1 je součástí HDLs a obsahuje apolipoprotein A-I (apoA-I), apolipoprotein L-I (apoL-I), haptoglobin-related protein (Hpr), human cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18), glykosylfosfatidylinositol specifickou fosfolipázu D (GPI-PLD), paraoxonázu a apolipoprotein A-II (apoA-II) (Molina-Portela *et al.* 2005).

TLF2 naopak obsahuje minimum lipidů, je to proteinový komplex složený z IgM, apoA-I, apoL-I Hpr, hCAP18 a GPIPLD (Raper *et al.* 1999; Molina-Portela *et al.* 2005).

Za cytotoxickou aktivitu je zodpovědný apoL-I, který je obsažen v obou faktorech.

2.2 Mechanismus působení trypanolytického faktoru

Lýze trypanosom je zahájena přijetím TLF1 s apoL-I, na čemž se pravděpodobně podílí především Hpr-Hb komplex a haptoglobin-hemoglobinový receptor (HpHbR) trypanosomy (Vanhollebeke *et al.* 2008). Takto je přijímán trypanolytický faktor 1. Část apoL-I, obsažená v trypanolytickém faktoru 2 do trypanosomy vstupuje jinou, zatím neznámou, cestou. Vanhollebeke *et al.* (2010) ve své studii uvádí, že by příjem TLF2 mohl být spjatý s nízkoafinitní a vysokokapacitní interakcí TLF2 s VSG, což by vysvětlovalo efektivitu faktoru i při častých změnách VSG. V interakci by mohla hrát roli IgM složka TLF2. Buněčným cílem apoL-I v trypanosomě je lysosom, v jehož membráně vytváří póry a způsobuje osmotický rozvrat buňky a lýzi (Molina-Portela *et al.* 2005).

2.3 Rezistence

T. b. gambiense a *rhodesiense* mají několik mechanismů, kterými mohou obejít smrtící aktivitu trypanolytického faktoru.

Vzhledem k tomu, že je doposud známa pouze cesta příjmu TLF1 pomocí HpHbR je možné, že u kmenů *T. b. gambiense*, kde je popsána rezistence na základě nefunkčního HpHbR, se vyskytují další dosud neznámé mechanismy rezistence.

2.3.1 *Trypanosoma brucei rhodesiense*

Na rozdíl od *T. b. gambiense* je pro *T. b. rhodesiense* charakteristická nestabilní a reverzibilní rezistence (Xong *et al.* 1998). *T. b. rhodesiense* je rezistentní díky VSG genu SRA (serum resistance-associated), který se vyskytuje u rezistentních kmenů s povrchovými glykoproteiny Etat 1.10 (Edinburgh trypanozoon antigen type). SRA protein pravděpodobně včasnou interakcí s apoL-I zabraňuje tvorbě lysosomálních pórů (Alsford *et al.* 2013). SRA protein je nejprve dopraven do flagelární kapsy, což je prostor vytvořen invaginovanou plazmatickou membránou, z níž vybíhá bičík (Field a Carrington 2009; Stephens a Hajduk 2011). Jejím prostřednictvím jsou na povrch a zpět do buňky dopravovány mnohé proteiny včetně VSG. Tímto způsobem se tedy SRA protein dostává na povrch trypanosomy, odkud je rychle endocytován zpět (Stephens a Hajduk 2011). Bylo zjištěno, že ke stěžejní interakci dochází intracelulárně, neboť ztráta glykosylfosfatidyl inositolové kotvy, která zajišťuje možnost extracelulárního výskytu proteinu, neměla vliv na kolokalizaci a citlivost vůči TLF1. Na zvýšenou degradaci a destabilizaci TLF1 má také zřejmě vliv aktivita cysteinové proteázy, která je spjatá s expresí SRA genu.

Enyaru *et al.* (2006) ve své studii poukazuje, že ne všechny infekční a vůči séru rezistentní kmeny *T. b. rhodesiense* mají SRA gen, což svědčí pro další dosud nepopsané mechanismy rezistence *T. b. rhodesiense*.

2.3.2 *Trypanosoma brucei gambiense*

U *T. b. gambiense* se vyskytuje několik dosud popsaných rezistenčních mechanismů:

Studiem genetické diverzity genu pro HpHbR byla objevena jedna konzervovaná substituce (leucinu za serin v pozici 210 genu pro HpHbR) vyskytující se u *T. b. gambiense* (Symula *et al.* 2012). Zároveň tato substituce chyběla u trypanosom senzitivních k trypanolytickému faktoru nebo trypanosom, které využívají jiné mechanismy rezistence. Díky této substituci zřejmě dochází k omezenému příjmu TLF1.

V další studii byla testována exprese genu pro HpHbR. Na rezistentním kmeni *T. b. brucei* (vyselektovaném v kultuře) byla objevena rezistence způsobená sníženou expresí genu pro HpHbR (Kieft *et al.* 2010). V tomto kmeni byl dále ektopicky exprimován gen pro HpHbR z *T. b. gambiense*, to však příjem TLF1 nezvýšilo. Autoři (Kieft *et al.* 2010) se proto domnívají, že v *T. b. gambiense* je snížena jak afinita vůči TLF1, tak samotná exprese receptoru.

Dále jsou známy kmeny *T. b. gambiense*, u kterých rezistence přímo nekoreluje se změnami exprese, či genu pro HpHbR (Capewell *et al.* 2011). Přesné mechanismy nejsou však známy.

3 Diagnostické metody

V pokročilé fázi může být nemoc s plně rozvinutými příznaky snadno diagnostikovatelná a to především v endemických oblastech výskytu trypanosomiázy. Avšak vzhledem k problematictější léčbě a průběhu druhé fáze onemocnění, je cílem detekovat a určit fázi trypanosomiázy co nejdříve (Van Meirvenne 1992). K tomu slouží tzv. screening.

Diagnostika trypanosomiázy způsobené *T. b. gambiense* tedy zahrnuje screening, případné potvrzení screeningového nálezu dalšími metodami a určení stadia nemoci. Diagnostika onemocnění způsobeného *T. b. rhodesiense* značně zaostává díky mnohonásobně nižší prevalenci (Simarro *et al.* 2011).

Screeningové metody pracují s velkým množstvím lidí a musí proto být dostatečně senzitivní, specifické, rychlé, jednoduché a levné. Senzitivita metody je dána procentuálním podílem počtu metodou zachycených případů ku skutečnému počtu případů, specifická pak procentuálním podílem počtu dle metody negativních případů ku skutečnému počtu negativních případů.

Optimálně by screeningové metody měly být dobře aplikovatelné v terénu. Aby byla zajištěna správnost výsledku, musí být pozitivní screeningový nález znovu potvrzen metodou přímo prokazující trypanosomy (viz dále) (Chappuis *et al.* 2005). U každého potvrzeného případu musí být stanovena i fáze trypanosomiázy. To se provádí po rozboru mozkomíšního moku na základě nadlimitních hodnot leukocytů (>5 buněk/ μ l) a proteinů (>37 mg/100 ml). Samotná přítomnost trypanosom není pro diagnostiku druhé fáze nezbytná (WHO 1998), nicméně jejich detekce se provádí po centrifugaci mozkomíšního moku, případně moderními metodami nepřímé diagnostiky jako jsou PCR a LATEX card agglutination test.

Každá země, jež se s problematikou diagnostiky trypanosomiázy potýká, má ve svém národním programu vlastní diagnostické schéma určující přesný diagnostický postup (Robays *et al.* 2004). V použitých screeningových metodách potom dominuje CATT (WHO 1998). Většina diagnostických metod byla vynalezena a optimalizována pro druh *T. b. gambiense*, proto se v následující kapitole budu zabývat především diagnostikou *T. b. gambiense*.

3.1 *Trypanosoma brucei gambiense*

3.1.1 Nepřímá diagnostika

Nepřímé diagnostické metody jsou založeny na nepřímém průkazu trypanosom v hostiteli. Zahrnují sledování symptomů trypanosomiázy, zhodnocení krevního obrazu, sérologické metody analyzující trypanosomové protilátky či antigeny a detekci nukleových kyselin pomocí PCR.

3.1.1.1 Klinické znaky a symptomy

Klinické symptomy se v obou fázích onemocnění výrazně liší.

I. fáze

V místě inokulace se může objevit kožní léze nebo trypanosomový šankr (spíše u *T. brucei rhodesiense*) (Van Meirvenne 1992). Dalším průvodním diagnostickým znakem mohou být kruhové erytémy, které však na tmavé pokožce nejsou zřetelné. Dále mohou být, jako u mnoha jiných infekčních onemocnění, palpačně detekovány oteklé lymfatické uzliny. Rovněž může být přítomna nepravidelně se opakující horečka, bolest hlavy, tachykardie, hepatosplenomegalie, pruritus, bolest kloubů a svalů atd.

II. fáze

U druhé fáze dochází k psychiatrickým, motorickým (narušením pyramidových a extrapyramidových drah a mozečku) a sensorickým poruchám (opožděná a zvýšená sensorická citlivost) (Chappuis *et al.* 2005). Typicky také dochází k narušení cirkadiálních rytmů, díky čemuž ostatně nemoc získala své jméno „spavá“.

Efektivita: Výše uvedené prvotní příznaky nemoci jsou nekonstantní a nespecifické. Příznaky druhé fáze, tedy po napadení CNS, jsou specifitější (Van Meirvenne 1992), ale přesnou diagnózu je vždy nezbytné stanovit na základě laboratorních testů (krve, mozkomíšního moku, případně lymfy) detekujících trypanosomy (WHO 1998). Tyto metody jsou popsány dále.

3.1.1.2 Krevní obraz

Podezření na trypanosomiázu může být vysloveno i na základě testování krevních markerů: např. sníženého hematokritu, zvýšené sedimentace, snížené hladiny albuminu, zvýšené hladiny protilátek Ig (především IgM) a tvorby imunokomplexů, poruch tvorby komplementu a koagulace a nefyziologických jaterních testů (Van Meirvenne 1992).

Efektivita: Biochemické krevní markery jsou příliš obecným ukazatelem: odrážejí obvykle systémovou infekci a nejsou tak vhodné pro detekci specifické infekce (Chappuis *et al.* 2005).

3.1.1.3 Sérologické metody

Trypanosomy mají potenciál exprimovat velké množství variabilních i invariabilních antigenních proteinů (Van Meirvenne 1992), což značně komplikuje použití sérologických metod, neboť některé kmeny v testech použité antigeny neexprimují (WHO 1998).

Trypanosomiáza může být nepřímo prokázána specifickými protilátkami v krvi, plasmě, séru nebo mozkomíšním moku. Typ v testu použitých antigenů ovlivňuje specifitu a senzitivitu testu (Chappuis *et al.* 2005).

3.1.1.3.1 CATT (Card agglutination test for trypanosomiasis)

Dnes majoritní screeningová metoda byla vyvinuta v roce 1978 (Magnus *et al.*). Slouží k diagnostice *T. b. gambiense* pomocí detekce specifických protilátek (v séru pacienta) proti definovaným variabilním povrchovým antigenům. Antigen je připravován jako fixovaná, obarvená a lyofilizovaná suspenze určitého klonu trypanosom s definovanou povrchovou antigenní strukturou (Magnus *et al.* 1978; Chappuis *et al.* 2005). V testech je používán variabilní antigen LiTat 1.3 (trypanozoon antigen type) (Chappuis *et al.* 2005). Samotný test je prováděn na plastové destičce s deseti kolečky, na která se nanášejí jednotlivé reagencie: kapka séra z testovaného pacienta + kapka suspenze připraveného antigenu (Magnus *et al.* 1978). V jednotlivých kolečkách je po 2 minutách otáčivého míchání odečtena případná seropozitivita způsobená aglutinací. Pro nejvyšší možné ředění séra, při němž je ještě patrná pozitivita reakce, byl stanoven tzv. koncový titr. Bylo zjištěno, že s délkou léčby ubývají protilátky a koncový titr séra nabývá nižších hodnot. Metodou CATT mohou být testovány vzorky krve i séra (Noireau *et al.* 1988).

Efektivita: Specifita i senzitivita metody CATT je podle většiny studií vysoká: Truc *et al.* (2002) uvádí specifitu až 95,2% a senzitivitu 98,5%, Robayse *et al.* (2004) senzitivitu 95%.

Problémem je, že při nižším ředění testovaného séra může test vykazovat zkřížené reakce (pravděpodobně díky jiným parazitickým infekcím) (Noireau *et al.* 1988). Při použití krve místo séra vykazuje metoda nižší senzitivitu (82,5%). Značný problém u této metody může představovat úzká antigenní specifita se zaměřením na antigen LiTat 1.3, protože podle některých studií (např. Dukes *et al.* 1992), tento antigen některé populace trypanosom neexprimují. CATT je v současnosti pro screening trypanosomiázy stěžejní metodou.

3.1.1.3.2 micro-CATT

Metoda micro-CATT vznikla jako snaha o vylepšení CATT (Noireau *et al.* 1991). Funguje na stejném principu, ale je použit suchý vzorek krve. Krev je nejdříve nanesena na filtrační papír. Při testu se pak na papírové disky se vzorkem nanáší kapka fyziologického roztoku a vzorek se tak z papíru zpětně vymyje. Ke vzorku se poté přidá kapka CATT reagencie (antigen), roztoky se smíchají a nechají pět minut, současně s jejich otáčením, reagovat. Poté je odečtena případná pozitivita testu.

Efektivita: Výhoda této metody se zdála být v použití suchého vzorku, se kterým by se v kontrolních masových programech lépe manipulovalo a odečítání by se eventuálně nemuselo provádět ihned. Avšak v pozdějších studiích se ukázalo, že micro-CATT vykazuje při použití v terénu sice poměrně vysokou specifitu (95,5%), ale nižší senzitivitu než CATT (89,4%) (Truc *et al.* 2002). Vyšší senzitivitu (95,5%) vykazovala tato technika pouze při zpracování v laboratoři a skladování vzorku při 4°C. Při dalších pokusech se skladováním při pokojové teplotě, klesla senzitivita micro-CATT metody po 7 dnech až na 50%. Metoda tedy neposkytuje výhodu pozdějšího zpracování vzorku a i při zpracování ihned má nižší senzitivitu než CATT.

3.1.1.3.3 LATEX card agglutination test

Metoda byla vynalezena (Büscher *et al.* 1991) pro detekci protilátek ze séra pacienta. Povrchové variabilní antigeny *T. b. gambiense* (LiTat 1.3, 1.5 a 1.6) jsou pro lepší vizualizaci reakce kovalentně navázány na latexové částice (Büscher *et al.* 1999). Stabilitu při vyšších teplotách (stejně jako u CATT) zajišťuje lyofilizace trypanosom. Test je prováděn opět na aglutinační kartě, kam je nanesena latexová suspenze a testované sérum. Poté jsou reagentie smíchány a po 5 minutách otáčení je odečten výsledek. Dle Büschera *et al.* (1999) je rovněž možné použít latexovou aglutinaci pro stanovení protilátek z mozkomíšního moku a určit tak i fázi onemocnění.

Efektivita: Dle Büschera *et al.* (1991, 1999) vykazuje test, při koncových titrech použitých sér 1:8 a 1:16, senzitivitu nad 90% a specifitu téměř 100%. Nižší senzitivita při nižším ředění séra je, stejně jako u ostatních sérologických metod, způsobeno křížovou reakcí způsobenou dalšími parazitózami. Podle novější studie (Truc *et al.* 2002) je metoda velmi specifická: 99,2%, ale nepříliš senzitivní: 71,2%. To může být zapříčiněno jednak stavbou antigenních struktur a jednak tím, že na rozdíl od senzitivnější metody CATT obsahuje test pouze třetinu antigenů LiTat 1.3 (neboť obsahuje ještě LiTat 1.5 a 1.6) a vykazuje tak nižší reaktivitu. Büscher *et al.* (1999) uvádí pro detekci v mozkomíšním moku specifitu 100% a senzitivitu 63,6%.

3.1.1.3.4 TrypTect CIATT (Card indirect agglutination trypanosomiasis)

V tomto testu jsou rovněž použity latexové částice, ale tentokrát jsou na ně navázány monoklonální specifické protilátky proti jednomu z vnitřních invariantních trypanosomových antigenů, který je společný *T. b. gambiense* i *rhodesiense* (Nantulya 1997). Pokud se při testování v séru pacienta nachází trypanosomové antigeny, jsou na ně latexové částice obalené protilátkou navázány. Sérum je aplikováno na kartu společně s testovanými protilátkami, reagentie jsou poté 2 minuty míchány a nakonec je odečtena případná pozitivita reakce, tedy aglutinace.

Efektivita: CIATT je dle Nantulya (1997) rychlá a 100% specifická a z 95,8% rovněž senzitivní metoda, která může být použita v terénu.

3.1.1.3.5 Imunofluorescence

Pro tuto metodu může být použit vzorek séra získaný vysrážením krve či vymytím krve z filtračního papíru (Wery *et al.* 1970). Antigen získaný z trypanosom, jež jsou pro tento účel namnoženy v potkanech, je nanesen na sklíčko, na které je pak přidáváno testované sérum. Vzorek se poté nechá reagovat ve vlhké atmosféře, dále je promýván fyziologickým roztokem, poté se na sklíčko přidají značené protilátky proti lidskému séru a nakonec je vzorek znovu promyt, překryt pufrovaným glycerinem a krycím sklíčkem. Vzorek musí být do 24h vyšetřen pod fluorescenčním mikroskopem.

Efektivita: Noireau *et al.* (1988) ve srovnávací studii z Konga uvádí specifitu 100% a senzitivitu 94,7%. Díky těmto hodnotám je dokonce tato metoda, jakožto screeningová, preferována před metodou CATT.

Metoda je rovněž rychlá a z vybavení vyžaduje pouze fluorescenční mikroskop a potkaní chov (Wery *et al.* 1970).

3.1.1.3.6 ELISA

Technika využívá reakce protilátek ze séra pacienta proti antigenům, které jsou připraveny z krevní formy trypanosomy (Nantulya 1997). ELISA jamky jsou nejdříve potaženy suspenzí obsahující antigen. Dále jsou zablokovány kravským odstředěným mlékem, poté je do jamek inokulováno sérum a vzorky jsou inkubovány. Potom jsou jamky dobře promyty a je k nim přidána protilátka proti lidskému séru s navázanou křenovou peroxidázou. Po další inkubaci a promytí je do jamky přidán substrát pro peroxidázu. Změna optické denzity je poté detekována a nadlimitní koncentrace určuje pozitivitu reakce.

Efektivita: Hlavní nevýhodou této metody je technická složitost jejího provedení. Jinak však metoda vykazuje vysokou senzitivitu a specifitu (Nantulya 1997).

3.1.1.4 Detekce DNA pomocí PCR

PCR (polymerázová řetězová reakce) se používá k detekci trypanosom v mozkomíšním moku a může být proto použita k určení stádia onemocnění (Truc *et al.* 1999). Pro PCR je nutné ze vzorku likvoru izolovat DNA následujícím způsobem: Nejdříve je vzorek zcentrifugován, poté je odstraněn supernatant a k peletu je přidán 5% roztok Chelexu. Suspenze je dále minutu vortexována a centrifugována, hodinu inkubována při 56 °C a znovu centrifugována. Po těchto krocích je v supernatantu přítomna DNA, kterou je dále možné skladovat při 4 °C maximálně 2 dny.

Efektivita: PCR se jeví jako velmi přesná metoda pro ověření trypanosom v mozkomíšním moku. Ve studii z roku 1999 (Truc *et al.*) byly pomocí PCR prokázány trypanosomy u 15 z 15 pacientů ve druhé fázi onemocnění (zatímco po běžně používané dvojité centrifugaci likvoru a následném mikroskopickém vyšetření byly prokázány pouze u 11 pacientů z 15 pozitivních).

3.1.2 Přímá diagnostika

Přímá diagnostika je založena na přímé mikroskopické detekci trypanosom v tělních tekutinách pacienta. Patří sem krevní nátěry, množství centrifugačních metod a detekce po předchozí kultivaci.

3.1.2.1 Přímý mikroskopický průkaz

Přímý mikroskopický průkaz trypanosom zahrnuje odběr tělních tekutin (podle fáze onemocnění: krev, lymfa, mozkomíšní mok), jejich zpracování a tvorbu preparátu.

I. fáze

Vzorek může být získán ze šankru (Van Meirvenne 1992), dále mohou být trypanosomy, po punkci

zvětšených uzlin, detekovány v lymfě a samozřejmě (po odběru venózní krve) v krvi.

Trypanosomy mohou rovněž být nalezeny v kostní dřeni nebo ascitu (WHO 1998).

II. fáze

Při určování druhé fáze jsou trypanosomy detekovány v likvoru.

3.1.2.1.1 Šankr

Odběr je prováděn punkcí. Vzorek je vyšetřován buď nativní nebo po fixaci a barvení Giemsou.

Efektivita: Tento druh odběru není v terénu příliš využíván, protože většina případů je zachycena později, kdy již šankr není přítomen (Chappuis *et al.* 2005).

3.1.2.1.2 Krev

V krvi jsou trypanosomy detekovány jak v nativních preparátech (vlhký roztěr), kde se sleduje jejich pohyb, tak po fixování metanolem a jejich obarvení (tenký roztěr, tlustá kapka) (WHO 1998).

Efektivita: Tyto metody jsou velmi levné a jednoduché, nicméně jejich senzitivita podstatně závisí na hladině parazitémie.

Vlhký roztěr vykazuje velmi nízkou senzitivitu (detekční limit je 10 000 trypanosom/ml) (Chappuis *et al.* 2005), ale z výše uvedených důvodů (cena, jednoduchost) je tato metoda stále používána.

Tlustá kapka má v některých studiích (Chappuis *et al.* 2005) nízký detekční limit: 5000 trypanosom/ml, ale podle Truca *et al.* (1994) je metoda velmi účinná: z 12 CATT+ pacientů byla u 12 pomocí metody tlusté kapky prokázána trypanosomiáza.

Kromě trypanosom mohou být těmito metodami rovněž detekovány plasmodia či mikrofilárie.

3.1.2.1.3 Lymfa

Mikroskopické vyšetření punktátu ze zvětšených lymfatických uzlin by mělo být provedeno u všech pacientů s CATT pozitivními výsledky a zvětšenými uzlinami (Chappuis *et al.* 2005). Vyšetřován je nativní preparát, ve kterém jsou ihned po vytvoření sledovány pohybující se trypanosomy. Před vyvinutím CATT byla detekce trypanosom v lymfě stěžejní diagnostickou metodou (Robays *et al.* 2004).

Efektivita: Tato metoda je rychlá, levná a jednoduchá. Senzitivita se pohybuje mezi 30-70% (WHO 1998). Záleží na správném provedení palpce, punkce lymfatických uzlin a následném potvrzení pod mikroskopem (na zkušenostech laboratorních pracovníků), na stadiu onemocnění (jsou zřetelnější v první fázi) a přítomnosti dalších nemocí způsobujících lymfadenopatii (zvětšení lymfatických uzlin) (Robays *et al.* 2004).

3.1.2.1.4 Mozkomíšní mok

Vyšetření likvoru je používáno především při určování fáze onemocnění. Likvor je mikroskopicky vyšetřován po jedné či dvou (vyšší senzitivita) centrifugacích (WHO 1998).

Efektivita: Metoda nevykazuje optimální senzitivitu. Ve studii Truca *et al.* (1999) byla jen u 11 z 15 nemocných prokázána trypanosomiáza. Dle Nantulya (1997) je senzitivita po jedné centrifugaci pouhých 24,7%, po dvou pak 44,2%.

3.1.2.2 Centrifugační metody

3.1.2.2.1 QBC (Quantitative buffy coat method)

Metoda QBC byla původně vynalezena pro detekci malárie. Pro diagnostiku trypanosom je používána od roku 1992 (Bailey a Smith). Je prováděna ve skleněných hematokritových zkumavkách potažených akridin-oranží a antikoagulantem. Při centrifugaci vzorku dochází k sedimentaci erytrocytů. Trypanosomy se poté nacházejí, společně s leukocyty, mezi krevní plasmou a erytrocyty – v tzv. „buffy coat“ zóně. Trypanosomy jsou detekovány pomocí fluorescence po obarvení akridin-oranží (WHO 1998).

Efektivita: Hlavní výhodou této metody je její vysoká rychlost (do 10 min) a senzitivita: 13 pozitivních testů ze 14 CATT + (Truc *et al.* 1994). I přesto, že jedním z důvodů vysoké rychlosti byl jednoduchý a rychlý odběr kapilární krve (z bříška prstu) a pozdější studie (Truc *et al.* 1998) ukázaly vyšší přesnost s použitím venózní krve, zůstává QBC metoda velmi rychlá a účinná a byla ve výše zmíněném článku (Truc *et al.* 1998) doporučena jako rutinní metoda pro kontrolní programy trypanosomiázy. Další výhodou je dobrá rozlišitelnost od leukocytů po obarvení jádra a kinetoplastu akridin-oranží a možnost detekce malárie. Metoda vykazuje 95% senzitivitu při koncentraci 450 trypanosom/ml (Ancelle *et. al.* 1997 v Chappuis *et al.* 2005). Detekční limit je dle WHO (1998) 16 trypanosom/ml.

Nevýhodou je počáteční vyšší investice do vybavení, které by pak ale mělo dlouho vydržet (Truc *et al.* 1998). Dále křehkost a složitost vybavení, které znesnadňují transport. (Chappuis *et al.* 2005).

3.1.2.2.2 m-HCT (microhaematocrit centrifugation technique)

Tato metoda je prováděna v kapilárních heparinizovaných zkumavkách, které jsou naplněny ze $\frac{3}{4}$ kapilární krví (Woo *et al.* 1970). Po vysokorychlostní centrifugaci se trypanosomy opět nacházejí v „buffy coat“ zóně. Dále jsou mikroskopicky vyšetřeny přímo ve zkumavce. Metoda je často používána v terénu (WHO 1998; Chappuis *et al.* 2005).

Efektivita: Efektivita této metody vzrůstá s počtem zkoumaných vzorků. Optimum se pohybuje mezi 6-8 zkumavkami. Detekční limit touto technikou je 500 trypanosom/ml. Metoda je průměrně časově náročná. Pokud se ve vzorku nachází současně i mikrofilárie, je vizualizace o mnoho menších trypanosom náročná. Při potvrzování CATT pozitivních pacientů v některých studiích (Truc *et al.* 1994) se metoda příliš

neosvědčila. Ve srovnávací studii z Côte d'Ivoire byla pouze u 7 z 16 CATT pozitivních trypanosomiáza potvrzena. Navzdory tomu může být dle Chappuis *et al.* (2005) technika použita pro hromadný screening.

3.1.2.2.3 mAECT (Mini-anion exchange technique)

Touto technikou jsou trypanosomy detekovány v eluátu po nízkorychlostní centrifugaci a průchodu krve aniont měničovou kolonou (Lumsden *et al.* 1979). Trypanosomy kolonou protékají, protože mají nižší náboj než erythrocyty (Chappuis *et al.* 2005). Eluát je poté zkoumán pod mikroskopem přímo ve špičce zkumavky. Metoda v původní podobě měla technický problém s nestabilním umístěním Pasteurových pipet používaných během centrifugace. Kvůli tomuto umístění docházelo k vysokým ztrátám (5-10% vzorku). Zillman *et al.* (1996) vynalezl konstrukci snižující ztráty na méně než 1%.

Efektivita: Dříve tato technika vykazovala dobré výsledky jen v rukou zkušených pracovníků (kvůli nestabilitě Pasteurových pipet), nyní je její provedení jednodušší. Metoda vykazuje i relativně vysokou senzitivitu: podle Truca *et al.* (1994) 12 pozitivních z 15 CATT + a 14 pozitivních z 15 CATT+ při opakovaném testování 2 zprvu falešně negativních vzorků, podle pozdějších studií 33 pozitivních z 38 CATT+ (Truc *et al.* 1998; WHO 1998). Velký objem vyšetřované krve (300 μ l) zvyšuje senzitivitu metody a detekční limit je proto vysoký: 100 trypanosom/ml (Chappuis *et al.* 2005), podle Zillmanna *et al.* (1996) dokonce 10 trypanosom/ml.

3.1.2.3 KIVI (Kit for in vitro isolation of trypanosomes)

Krev z pacienta (5-10ml) je inokulována do média a kultivována při teplotě okolí (Aerts *et al.* 1992). Krevní forma se během 3-4 týdnů přemění v procyklickou, proliferující formu (Chappuis *et al.* 2005). Trypanosomy jsou poté, pokud jsou v testovaném vzorku a následně kultivačním médiu přítomny, snadno mikroskopicky detekovány.

Efektivita: V dřívějších studiích (Truc *et al.* 1994) byla zjištěna vysoká senzitivita této metody odhalením infikovaného pacienta, při současně falešně negativních výsledcích ostatních metod (CATT, mHCT, QBC, mAECT).

Nevýhodou je dlouhá doba čekání (ve výše zmíněném výzkumu až 30 dní). Pro běžný provoz je také in vitro kultivace drahá. Navíc pokud je médium kontaminováno, růst trypanosom může být potlačen.

3.1.2.4 In vivo inokulace

Pro diagnostiku *T. b. gambiense* jsou používána morčata, potkani a krysa mnohobradavková (*Mastomys natalensis*).

Efektivita: Snížená imunita laboratorních zvířat zvyšuje senzitivitu metody (WHO 1998). Pro plošný screening je metoda příliš drahá.

3.1.3 Efektivita diagnostických metod

Přímý mikroskopický průkaz trypanosomiázy je obtížný vzhledem k variabilní hladině parazita v tělních tekutinách (100-10000/ml). Trypanosomy touto metodou tudíž nemusí být vždy zachyceny (Chappuis *et al.* 2005). Přímá mikroskopická detekce je ovšem levná a jednoduchá (WHO 1998).

Účinnější jsou metody ověřující přítomnost trypanosomy využívající krevní centrifugaci: mHCT, QBC a mAECT (Truc *et al.* 1994; Chappuis *et al.* 2005), přičemž QBC je minimálně stejně senzitivní jako mAECT (Truc *et al.* 1998), mHCT o něco méně (Truc *et al.* 1994).

Truc *et al.* (1994) ve své studii kupodivu uvedl vysokou senzitivitu rovněž pro metodu tlusté kapky.

Nejefektivnější screeningovou metodou je bezesporu CATT (Robays *et al.* 2004). Vysoká senzitivita a specifita je ale prokázána i u imunofluorescence, která je však oproti CATT náročnější na vybavení i čas (Noireau *et al.* 1988).

Obecným problémem ve studiích diagnostických metod je nízká statistická hodnota zapříčiněná nízkým počtem (potvrzených) nakažených pacientů, kteří jsou ve studii použiti. V práci z Côte d'Ivoire (Truc *et al.* 1994) je tak detekováno např. pouze 114 nemocných. Na druhou stranu studií bylo pro každou metodu provedeno vícero, a pokud vykazují podobné výsledky, mohou být brány jako relevantní.

Dalším faktorem ovlivňujícím relevanci diagnostického procesu je nutnost současné positivity screeningového testu a některé z metod přímé diagnostiky, které nemusí v případě přímých mikroskopických metod vykazovat tak vysokou senzitivitu (WHO 1998). Je-li tak pacient např. CATT pozitivní, ale parazitologicky negativní, je i přes vysoké riziko chybného parazitologického vyšetření nediodagnostikován. WHO (1998) proto doporučuje takto rizikové pacienty vyšetřovat po 1-2 roky každých 3-6 měsíců, dokud jejich sérologické testy nebudou negativní.

Dále je doporučováno použití metod, kde je testováno větší množství krve, čímž je zvýšena pravděpodobnost záchytu trypanosom (Chappuis *et al.* 2005). Také je důležité minimalizovat čas mezi odběrem vzorku a jeho zpracováním, aby nedošlo ke ztrátě pohyblivosti a lýzi trypanosom. Vzorek musí být rovněž správně uchováván, a to ve tmě a chladu.

Efektivitu screeningových programů pak samozřejmě značně ovlivňuje nízká účast obyvatelstva v těchto programech a nízká senzitivita používaných parazitologických potvrzovacích metod (Robays *et al.* 2004). Vzhledem k nespecifickým symptomům první fáze je nemoc také často detekována relativně pozdě nebo není metodami zachycena, popř. je v oblastech s nízkou prevalencí onemocnění chybně diagnostikována (WHO 1998).

Neposledním problémem je vysoká cena aktivního screeningu rizikové populace. Ač je tak nyní k dispozici mnoho parazitologicky senzitivnějších metod než dříve, jsou nedostupné pro masové použití v chudých rozvojových zemích, jež jsou trypanosomiázou nejvíce zasaženy. Hlavním cílem vývoje v této oblasti je tedy minimalizace nákladů. K té může dojít např. nanášením vzorků na savé papíry, což by umožnilo snazší

a rychlejší sběr a transport vzorků v terénu a při následném použití micro-CATT testu i snížení množství testovací suspenze (WHO 1998). Problémem je horší zpětné dohledání pozitivních pacientů při převozu vzorků k laboratornímu vyšetření.

3.2 *Trypanosoma brucei rhodesiense*

3.2.1 Přímá diagnostika

T. b. rhodesiense je možné díky vysoké parazitémii detekovat metodami přímé mikroskopie (vlhký, tenký roztěr a tlustá kapka) lépe než *T. b. gambiense* (Woo 1970). Dále může být z metod přímé diagnostiky použita mHCT.

3.2.2 Nepřímá diagnostika

U T. b. rhodesiense nacházíme, kromě akutních horečnatých stavů, řadu nespecifických symptomů. Ve většině případů je po inokulaci trypanosom, na rozdíl od *T. b. gambiense*, přítomen šankr (Chappuis *et al.* 2005).

Dodnes není vyvinut spolehlivý ekvivalent CATT pro screening *T. b. rhodesiense* (Chappuis *et al.* 2005). Screening je tak prováděn na základě klinických symptomů a znaků.

Mohl by být ale použit CIATT, který má dle studií (Nantulya 1997) senzitivitu 97,7% a specifitu 100%.

Ve výzkumných centrech jsou používány i další metody jako ELISA a imunofluorescenční mikroskopie, ale jejich senzitivita je proměnlivá a díky technické náročnosti nemohou být použity rutinně (Chappuis *et al.* 2005).

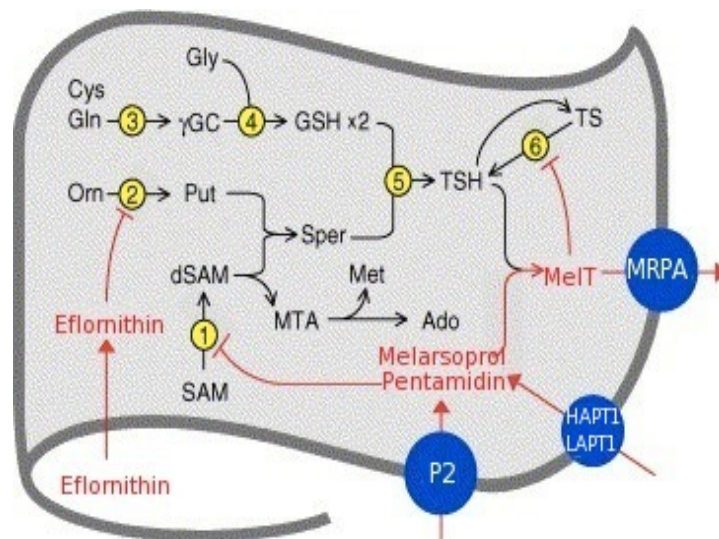
Kvůli těžkému akutnímu průběhu je onemocnění častěji diagnostikováno až se znatelnými symptomy (WHO 1998). V endemických oblastech je při propuknutí onemocnění z ekonomických důvodů omezen aktivní screening a sami nakažení pacienti vyhledávají zdravotní centra.

Vývoj nových screeningových testů je tak pro *T. b. rhodesiense* důležitý především kvůli případům, kdy má jindy akutní forma onemocnění chronický průběh a symptomy nejsou směrodatným ukazatelem původce (Chappuis *et al.* 2005).

4 Léčba

Léčba spavé nemoci se kvůli různému výskytu trypanosom liší v obou fázích onemocnění. Léky používané pro léčbu první fáze nemohou být často použity ve fázi druhé, neboť tyto látky neprocházejí v dostatečném množství přes hematoencefalickou bariéru (Wenzler *et al.* 2009).

Používané léky ovlivňují především glykolýzu, na které jsou krevní formy trypanosom energeticky závislé a biosyntézu aminů, které hrají roli v syntéze DNA, RNA a proteinů (Nishimura *et al.* 2006). Polyaminy jsou rovněž zahrnuty v syntéze trypanothionu (N1,N8-bisglutathionyl spermidin), pro trypanosomy unikátního metabolitu, který je stěžejní pro regulaci oxidačního stresu buňky. Dále se podílí (prostřednictvím ribonukleotidredukázy) na syntéze DNA a proliferaci trypanosom. Na níže uvedeném obr. 2 jsou schématicky znázorněny některé známé mechanismy léků působících na metabolismus polyaminů.



Obr. 2: Trypanocidní léky působící na metabolismus polyaminů (upraveno podle Mäser *et al.* 2013).

Ve žlutých kolečkách jsou enzymy: 1) S-adenosyl-L-methionin dekarboxyláza; 2) ornithin dekarboxyláza; 3) gama-glutamylcystein syntáza; 4) glutathion syntáza; 5) trypanothion syntáza; 6) trypanothion reductáza, červeně jsou označeny léky a bíle transportery.

Eflornithin: Způsob, jakým je buňkou přijímán není znám. Eflornithin ireverzibilně inhibuje ornithin dekarboxylázu.

Melarsoprol: Je přijímán purin nukleosidovým transporterem P2. Melarsen-trypanothionový adukt inhibuje trypanothion reductázu. Ve spojení s trypanothionem je také zřejmě vylučován MRPA transporterem, což způsobuje zvýšení rezistence trypanosom vůči melarsoprolu.

Pentamidin: Pentamidin je přijímán několika transportery: P2, HAPT1 (high-affinity pentamidine transporter 1) a LAPT1 (low-affinity pentamidine transporter 1). Působí inhibičně na S-adenosyl-L-methionin dekarboxylázu.

Ado = adenosin; Cys = cystein; dSAM = S-adenosylmethioninamin; Gln = glutamin; Gly = glycin; GSH = glutathion; MeIT = melarsen-trypanothionový adukt; Met = methionin; MTA = methylthioadenosin; Orn = ornithin; Put = putrescin; SAM = S-adenosyl-L-methionin; Sper = spermidin; TS/TSH = trypanothion; gammaGC = gama-glutamylcystein

Vývoj nových léků směřuje (opět) k inhibici glykolýzy a metabolismu polyaminů, dále k inhibici metabolismu purinů, biosyntézy VSG a proteináz (enzymů, receptorů a genů) (WHO 1998).

Přesné cíle a mechanismy účinků používaných léků nejsou známy. Je také možné, že léky nemají určitý cíl, ale spouštějí v trypanosomě apoptózu (např. diamidiny vazbou na DNA) (Mäser *et al.* 2003).

Doposud nebyla vyvinuta žádná vakcína proti spavé nemoci, což je přisuzováno velké antigenní variabilitě trypanosom.

Chemoprolaxe ve smyslu preventivního podávání léků není doporučována, protože může maskovat druhou fázi trypanosomiázy, popř. vést k rezistenci trypanosom vůči lékům (WHO 1998).

Po ukončení léčby by dle WHO (1998) měl být pacient dále po dva roky průběžně kontrolován (po 3 a 6 měsících a dále v šestiměsíčních intervalech), aby byl odhalen případný relaps onemocnění. Na kontrolách by měla být vyšetřena krev a mozkomíšni mok stejně jako při standardní diagnostice.

4.1 I. fáze

V I. tzv. hemolymfatické fázi trypanosomiázy se trypanosomy vyskytují v lymfatickém a cévním řečišti, proto jsou trypanocidními látkami snadno dosažitelné. K léčbě první fáze mohou být použity i léky nasazované ve druhé fázi onemocnění. Kvůli vyšší toxicitě jsou však používány pouze v pokročilejším stadiu nemoci.

4.1.1 Pentamidin

Chemicky je pentamidin aromatický diamidin (Wenzler *et al.* 2009).

Lépe působí proti *T. b. gambiense*, dá se však, s menší účinností, použít i proti *T. b. rhodesiense* (Bacchi 2009).

Mechanismus působení

Pentamidin snižuje hladinu glukózy v krvi a v malém množství překračuje i hematoencefalickou bariéru (WHO 1998). Látka se akumuluje v kinetoplastech, váže se k malému žlábků kinetoplastové DNA a způsobuje štěpení minikroužků (inhibicí topoizomerázy typu II) vedoucí až ke ztrátě kinetoplastu, nepoškozuje však zřejmě jadernou DNA (Mäser *et al.* 2003; Bacchi 2009; Shapiro a Englund 1990). Pentamidin ovšem inhibuje rovněž i mitochondrie savčích buněk (Mäser *et al.* 2003).

Trypanocidní účinek pentamidinu závisí především na jeho akumulaci v trypanosomách (De Koning 2001). Trypanosomy mají alespoň dva nukleosidové transportery: P1 a P2 (Carter *et al.* 1995), přičemž adenosinový transporter P2 je zřejmě zapojen do příjmu pentamidinu a melarsoprolu, který má ve svém melaminovém kruhu stejný rozpoznávací motiv (Mäser *et al.* 2003). Jsou-li některé kmeny trypanosom vůči arsenovým lékům rezistentní, vykazují rovněž zkříženou rezistenci vůči pentamidinu (Carter *et al.* 1995). Naopak

u arsen senzitivních trypanosom v kultuře bylo v přítomnosti diamidinů a melarsenu zabráněno lýzi. Pentamidin tedy zřejmě P2 adenosinový transporter také inhibuje. V dalších studiích však bylo zjištěno, že trypanosomy zůstávají pentamidin-senzitivní i při ztrátě P2 transporteru, což naznačovalo přítomnost dalších transporterů (Barrett *et al.* 2007). Později (De Koning 2001) byly objeveny další dva transportery účastníci se transportu pentamidinu: HAPT1 (high-affinity pentamidine transporter 1) a LAPT1 (low-affinity pentamidine transporter 1). Tento rok byl transporter HAPT 1 identifikován jako aquaglyceroporin 2 (Munday *et al.* 2014) a byla zjištěna silná pentamidinová a melarsoprolová rezistence při delecí genu pro tento kanál (TbAQP2). Bylo však rovněž zjištěno, že je síla exprese genů pro transportery P2 a HAPT1 rozdílná u trypanosom v kultuře oproti expresi trypanosom v hostiteli.

Další studie ukazují, že na příjmu pentamidinu se zřejmě podílí i protonmotivní síla generovaná membránovou H⁺ ATPázou (Alsford *et al.* 2012).

Dále byl objeven i jeden z potenciálních buněčných cílů pentamidinu: S-adenosyl-L-methionin dekarboxyláza (SAMDC), účastníci se biosyntézy polyaminů, která je pentamidinem inhibována (Bitonti *et al.* 1986). V nedávných studiích na Leishmaniích (Roberts *et al.* 2002), pro které je pentamidin také toxický, však bylo experimentálně zjištěno, že to zřejmě není hlavní cytotoxický cíl (linie s overexprimovaným SAMDC vykazovaly vůči pentamidinu stejnou senzitivitu jako bez SAMDC) a přesný mechanismus příjmu a následného zacílení v trypanosomě stále není znám.

Způsob podání

Doporučené dávkování: jednou za 7 dní 4 mg pentamidin isethionátu / 1 kg pacientovy váhy, intramuskulárně, příp. je možné podání intravenózně infúzí (WHO 1998). Po podání by měli být pacienti hodinu pozorování kvůli riziku hypertenze a bezvědomí.

Vedlejší účinky

Intramuskulární podání může způsobit lokální reakce, jako jsou bolest, absces nebo nekróza (WHO 1998). Další časté vedlejší příznaky jsou: hypotenze, bolest břicha, nadměrné slinění, závratě, nevolnost a bolest na hrudi a hypoglykémie. Dále mohou být poškozeny ledviny.

Efektivita

Léčba pentamidinem v první fázi onemocnění je účinná z 98% (WHO 1998). Relaps se objevuje u 7% pacientů (Robays *et al.* 2004; Truc *et al.* 2012). Podle WHO (1998) by mohlo být množství podávané účinné látky výrazně nižší. Případný nový postup ovšem ještě musí projít klinickým testováním.

4.1.2 Berenil

Berenil je také aromatický diamidin, který byl však primárně schválen k použití pro léčbu zvířecí trypanosomiázy, nagany (Bacchi 2009). Nicméně byl zřejmě použit i na řadu pacientů, ačkoliv nejsou publikovány klinické studie na lidech.

Je účinný proti *T. b. gambiense* i *rhodesiense* (Bacchi 2009). Zřejmě inhibuje efektivněji SAMDC než pentamidin.

4.1.3 Suramin

Suramin byl vůbec prvním (1916) vynalezeným lékem proti trypanosomiáze (Mäser *et al.* 2003). Chemicky je suramin sulfonovaný naftylamin (Bacchi *et al.* 2009).

Lék se používá hlavně proti *T. b. rhodesiense* a to především kvůli nedostatečné účinnosti suraminu zaznamenané v 50. letech a komplikovanější aplikaci (viz dále) (Bacchi *et al.* 2009; Barrett *et al.* 2007).

Suramin má díky silným vazbám k sérovým proteinům velmi dlouhý biologický poločas: 44-54 dní (Bacchi 2009), což zajišťuje dlouhodobý trypanocidní účinek.

Mechanismus působení

Suramin je navázán na lidský LDL (low density lipoprotein), který je pro trypanosomy základním zdrojem sterolů a je jimi proto vychytáván. Dříve bylo předpokládáno, že ve vazbě na LDL vstupuje suramin do trypanosomy (Bacchi *et al.* 2009). V novějších studiích byl detekován invariantní povrchový glykoprotein ISG75, který pravděpodobně zprostředkovává transport suraminu (Alsford *et al.* 2012).

Hlavním cílem suraminu v trypanosomách je zřejmě, pro krevní formy esenciální glykolýza (Barrett *et al.* 2007). Suramin inhibuje glykolýzu interferencí s enzymy glykolitické dráhy (WHO 1998), přičemž klíčový mechanismus selekce je zřejmě zajištěn reakcí silně záporně nabitě molekuly suraminu s kladně nabitými enzymy trypanosomy, které mají vyšší izoelektrický bod než enzymy savců (Bacchi 2009). Glykolitické enzymy jsou obsaženy v cytosolu a glykosomech, organelách obalených membránou. Toto umístění nedovoluje rychlou a masivní inhibici enzymů. Je také možné, že suramin inhibuje nově syntetizované glykolitické enzymy ještě předtím než jsou dopraveny do glykosomu.

Dalším z cílů suraminu je třetí enzym pentózofosfátové dráhy: 6-fosfoglukonát dehydrogenáza (Hanau *et al.* 1996), který je suraminem inhibován. To způsobuje zvýšení koncentrace 6-fosfoglukonátu, který pravděpodobně inhibuje fosfoglucoizomerázu, další z glykolitických enzymů.

Lék je zřejmě zodpovědný i za inhibici dalších enzymů: thimidinkinázy a dihydrofolát reduktázy (Bacchi 2009).

Suramin dále inhibuje jaderný enzym trypanosomy, topoizomerázu II, což by zároveň mohl být další z cytotoxických mechanismů léku (Bojanowski *et al.* 1992). Látka dále ovlivňuje metabolismus polyaminů v buňce interferencí s ornithin dekarboxylázou, enzymem zahrnutým v jejich biosyntéze (Girtli-Linde *et al.* 1998). Přesný mechanismus účinku není znám.

Způsob podání

Suramin při intramuskulárním podání způsobuje silnou lokální reakci, proto je podáván intravenózně (WHO 1998). Dávkování suraminu se stanovuje na základě tolerance pacienta ke zvyšujícím se dávkám léku (1. den

5mg/1kg, dále 20mg/1kg, až do 1g/1kg). Pro zlepšení celkového zdravotního stavu pacienta jsou podávána antihelmintika a antimalarika.

Vedlejší účinky

Ihned po podání se může dostavit nevolnost, zvracení, kopřivka i bezvědomí (WHO 1998). Dále se po několika hodinách může objevit horečka, fotofobie, slzení, poruchy ledvin, exfoliativní dermatitida (zánětlivé onemocnění kůže) a agranulocytóza (onemocnění způsobené výrazným poklesem hladiny granulocytů).

Efektivita

Zatím není zaznamenán žádný případ rezistence vůči suraminu (WHO 1998).

4.2 II. fáze

Léky používané ve II. fázi onemocnění, v tzv. meningocefalickém stadiu, kdy se trypanosomy vyskytují v mozkomíšním moku, mají nejen trypanocidní efekt, ale i schopnost průniku hematoencefalickou bariérou. Jsou toxičtější než léky používané v léčbě I. fáze.

4.2.1 Melarsoprol

Melarsoprol je chemická sloučenina trypanocidního melarsenoxidu a dimerkaprolu, který slouží jako látka tlumící toxické účinky melarsenoxidu (Steverding 2010).

Může být použit v první i druhé fázi onemocnění (WHO 1998). Kvůli četným vedlejším účinkům je však často používán pouze ve druhé fázi.

Lék účinkuje na *T. b. gambiense* i *T. b. rhodesiense*.

Mechanismus působení

Melarsoprol je stejně jako pentamidin přijímán membránovým purin nukleosidovým transporterem P2 (Bacchi 2009).

Již v nízkých koncentracích (1-10 μ M) melarsoprol působí trypanolyticky (Bacchi 2009). Působí inhibičně na několik enzymů glykolitické dráhy: pyruvátkinázu, fosfofruktokinázu a 2,6-bisfosfatázu.

Melarsenoxid dále ireverzibilně inhibuje 6-fosfoglukonát dehydrogenázu, což stejně jako u suraminu vede k akumulaci 6-fosfoglukonátu, který inhibuje fosfoglucoizomerázu (Hanau *et al.* 1996). Experimentálně však bylo zjištěno (Hanau *et al.* 1996), že inhibice 6-fosfoglukonát dehydrogenázy není primárním mechanismem inhibice glykolýzy, neboť lyze probíhá u trypanosom metabolizujících glukózu i fruktózu (která je při vstupu do glykolytické dráhy na fosfoglucoizomeráze nezávislá).

Melarsenoxid interaguje s mnoha sloučeninami obsahujícími thioly, jako jsou: trypanothion, dihydrolipoát a cysteinové zbytky mnohých proteinů (Bacchi 2009). Melarsen-trypanothionový adukt pak inhibuje

trypanothion reduktázu, která hraje úlohu v buněčné detoxifikaci. Dle studie Kriegera *et al.* (2000) však při významně snížené expresi genu pro trypanothion reduktázu zůstává citlivost trypanosom vůči melarsenoxidu nezměněna. Mechanismus působení tak opět není znám a za cytotoxicitu zodpovídá zřejmě více faktorů. V nedávných studiích (Alsford *et al.* 2012) bylo zjištěno, že citlivost trypanosom vůči melarsoprolu je také pravděpodobně ovlivňována signální kaskádou a proteinkinázami.

Na rezistenci se zřejmě podílí transporter *TbMRPA* patřící do skupiny MRP tzn. multidrug resistance protein, který transportuje cizorodé látky konjugované s trypanothionem ven z buňky (Sanjay *et al.* 2002). Bylo zjištěno, že s overexpresí tohoto transporteru vzrůstá rezistence vůči melarsoprolu.

Způsob podání

Obvykle je léčba melarsoprolem zahájena jednou či dvěma injekcemi léku první fáze (pentamidin, suramin) ke zničení trypanosom v krvi a lymfě. Melarsoprol je poté periodicky injekčně podáván (intravenózně) 3-4 dny, potom následuje 7-10 denní pauza a poté je lék znovu podán (WHO 1998). Melarsoprol je nerozpustný ve vodě, je proto podáván rozpuštěný v propylenglykolu, což způsobuje bolestivost a po několika aplikacích dokonce způsobuje zničení cév (Bacchi 2009).

Toxické účinky mohou být zmírněny podáním kortikosteroidů (Sina *et al.* 1982) s dávkováním 1 mg prednisolonu / 1 kg váhy těla (WHO 1998). Podávání by mělo být zahájeno den před prvním podáním melarsoprolu a rychle ukončeno spolu s koncem léčby trypanosomiázy.

Vedlejší účinky

Do dvou týdnů od počátku aplikace se mohou dostavit vedlejší účinky jako bolesti hlavy, tremor (třes), poruchy řeči a záchvaty (WHO 1998). U 10% melarsoprolem léčených pacientů se objevuje reaktivní encefalopatie (progrese neuropatologických lézí, jež jsou vytvořeny během 2. fáze nemoci) po které často následuje plicní edém a smrt (Bacchi 2009; Kennedy 1999). Častým vedlejším příznakem je parestézie (porucha čítí, mravenčení) (WHO 1998). Méně často se mohou v průběhu léčby vyskytnout renální a jaterní poruchy, hypersenzitivita, agranulocytóza a periferní neuropatie (poruchy periferních nervů). Dále se mohou vyskytnout četné, ne tak závažné vedlejší efekty, jako kopřivka, kojunktivitida (zánět spojivek), zvracení atp.

Efektivita

V současnosti je to jediný běžně dostupný lék působící v druhé fázi trypanosomiázy (WHO 1998) a jediný lék pro léčbu druhé fáze způsobené *T. b. rhodesiense* (Steverding 2010). Vysoká toxicita melarsoprolu může být snížena úpravou dávkování tj. zjištěním minimální efektivní dávky léku, která by zřejmě mohla být nižší než je nyní používána. Také by měly být vypracovány lepší způsoby podání léku, protože je z krve příliš rychle vylučován a nemusí tak procházet v dostatečném množství hematoencefalickou bariérou.

Velkým nebezpečím je v posledních letech rapidní nárůst rezistence vůči melarsoprolu (Mäser *et al.* 2003). V některých oblastech byla rezistence zachycena až u 30% pacientů (Barrett *et al.* 2007). Většina trypanosom vykazujících rezistenci nemá, popř. má defektní, P2 transporter. V roce 2005 byl pro detekci

rezistence trypanosom vůči melarsoprolu vynalezen tzv. fluorescentní test, který umožňuje rychle detekovat, zda trypanosomy mají funkční P2 transporter (Stewart *et al.* 2005). P2 transporterem prochází totiž fluoreskující diamidin DB99, který je v případě funkčního transporteru do 1 min v buňce detekován.

4.2.2 Eflornithin

Eflornithin, neboli α -difluoromethylornithin (DFMO), je flourovaný analog aminokyseliny (Steverding 2010).

Lék je používán na *T. b. gambiense*, většina kmenů *T. b. rhodesiense* je totiž vůči eflornithinu tolerantní (Iten *et al.* 1997).

Eflornithin má krátký biologický poločas, kolem 3h (Barret *et al.* 2007) a musí proto být aplikován relativně často.

Mechanismus působení

Ačkoliv v některých studiích (Iten *et al.* 1997) bylo publikováno, že je eflornithin přijímán difúzí, není to díky jeho polárnímu charakteru příliš pravděpodobné (Barrett *et al.* 2007).

Lék ireverzibilně inhibuje ornithin dekarboxylázu (váže se v katalytickém místě enzymu), první enzym biosyntézy polyaminů v trypanosomách (Bacchi 2009). To vede ke snížení polyaminů putrescinu a spermidinu a k útlumu proliferace trypanosom (Steverding 2010). Eflornithin tedy nepůsobí přímo trypanolyticky a pro úplnou eliminaci je nutný funkční imunitní systém hostitele (ve studiích u zvířat s potlačenou imunitou docházelo k relapsům onemocnění) (Bitonti *et al.* 1986b). V důsledku nižší koncentrace spermidinu a putrescinu dochází i ke snížení koncentrace trypanothionu a naopak je zvýšena koncentrace S-adenosylmethioninu (i dekarboxylovaného) (Fairlamb *et al.* 1987).

Nishimura *et al.* (2006) ve své studii uvádí, že některé kmeny *T. b. gambiense* mohou importovat polyaminy z extracelulárního prostředí a do jisté míry tak obcházejí efekt inhibice ornithin dekarboxylázy. U sledovaného kmene byla však rovněž zjištěna vyšší senzitivita vůči oxidativnímu stresu vzhledem k potřebě produkce většího množství polyaminů k redukci oxidativního poškození.

Fakt, že eflornithin působí pouze na *T. b. gambiense* je zřejmě dán rozdílnou stabilitou cílového enzymu, tzn. ornithin dekarboxylázy, u obou druhů (Iten *et al.* 1997). *T. b. rhodesiense* má mnohem nižší stabilitu ornithin dekarboxylázy než *T. b. gambiense*. U *T. b. rhodesiense* byla identifikována delší mRNA pro ornithindekarboxylázu, což by mohlo hrát roli v regulaci syntézy a degradace této mRNA a následného proteinu.

Z tohoto důvodu nejsou napadány ani lidské buňky (neboť mají také nižší stabilitu ornithin dekarboxylázy).

U hmyzích forem, které vykazovaly rezistenci vůči eflornithinu, byl zaznamenán snížený příjem eflornithinu (Barrett *et al.* 2007).

Způsob podání

Eflornithin je používán při léčbě pacientů, kteří jsou ve druhé fázi trypanosomiázy a nereagují na léčbu melarsoprolem (Steverding, 2010).

Doporučené dávkování je dle WHO (1998) pro dospělé denně 400 mg/1 kg váhy pacienta po dobu 14 dní, intravenózně. Pro děti se dávkování vztahuje na povrch těla: 4 g/m².

Vedlejší účinky

Není jisté, zda eflornithin přispěl ke smrti pacientů (6%), u nichž byl kombinován eflornithin s melarsoprolem (WHO 1998). U pacientů, u kterých byl podáván orálně, byl častým vedlejším příznakem průjem.

Mezi další časté účinky patří poruchy krvetvorby jako anémie (nízká hladina červených krvinek), trombocytopenie (nízká hladina krevních destiček), leukopenie (snížený počet bílých krvinek), dále záchvaty, zvracení a horečka. Všechny vedlejší účinky jsou s vysazením eflornithinu reverzibilní.

V nedávných studiích (Truc *et al.* 2012) jsou ovšem dokumentovány i případy fatální reaktivní encefalopatie.

Efektivita

Dle WHO (1998) se u 5,3 % pacientů objevil brzy po léčbě relaps onemocnění, 6,9 % pacientů zemřelo a 0,8 % na léčbu nereagovalo. Po 12 měsících byl dále relaps zjištěn u 6,7 % dospělých a 35,7 % dětí do 12 let. Truc *et al.* (2012) uvádí relaps onemocnění u 6,6% pacientů.

Mezi hlavní nevýhody léčby eflornithinem patří krátký biologický poločas v plazmě, který vyžaduje časté podávání (Bacchi 2009), vysoká cena pohybující se okolo 500 US \$ za pacienta (Mäser *et al.* 2003) a použitelnost pouze na infekce způsobené *T. b. gambiense*.

Velkou výhodou je ovšem na rozdíl od melarsoprolu nižší toxicita a méně závažné vedlejší účinky (Barrett *et al.* 2007).

4.2.3 Nifurtimox

Nifurtimox je synteticky vyrobený nitrofurán (WHO 1998), který byl původně vyvinut pro léčbu Chagasovy choroby.

Nifurtimox ještě není plně schválen, je používán v klinických testech, zejména v použití v kombinacích s jinými léky (Barret *et al.* 2007).

Nifurtimox je použitelný pro léčbu *T. b. gambiense*, pro *T. b. rhodesiense* lék nebyl testován (WHO 1998; Steverding 2010).

Mechanismus působení

Mechanismus působení je neznámý (WHO 1998). Redukcí nitrofuranu vznikají volné radikály, které zřejmě mají na trypanosomy hlavní cytotoxický účinek (Barrett *et al.* 2007). V trypanosomách je nifurtimox pravděpodobně aktivován nitroreduktázou typu I.

Způsob podání

Dávkování se dle WHO (1998) pohybuje mezi 15-20 mg/1kg váhy pacienta. Délka léčby trvá mezi 30 a 60 dny.

Vedlejší účinky

Nifurtimox má mnoho vedlejších účinků ovlivňujících centrální a periferní nervový systém, např. záchvaty, nystagmus (trhavé, rychlé pohyby očních bulbů) , polyneuropatii, břišní nevolnost, vyrážku atd. (WHO 1998)

Stejně jako další nitroheterocykly působí nifurtimox genotoxicky na lidské buňky (Barrett *et al.* 2007).

Efektivita

Nifurtimox se podává pouze při léčbě pacientů, jež mají *T. b. gambiense* rezistentní vůči melarsoprolu (WHO 1998; Steverding 2010). U *T. b. gambiense* se procento úspěšně vyléčených pohybuje mezi 50-80% pacienty.

4.3 Kombinace léků

Současné použití více trypanocidních léků skýtá několik výhod. Součinnost dovoluje snížení dávek jednotlivých léků, což by mělo vést i ke snížení vedlejších účinků a jednoduššímu, kratšímu a levnějšímu podávání (Barrett *et al.* 2007; Priotto *et al.* 2006). Dále by měla být snížena možnost selekce a rezistence vůči používaným lékům (Priotto *et al.* 2006).

Při léčbě druhé fáze trypanosomiázy jsou často kombinovány léky první a druhé fáze, aby bylo před léčbou CNS vyčištěno krevní řečiště (WHO 1998).

Suramin má schopnost při současném podání s dalšími látkami, zřejmě díky inhibici Mdr1 (Multiple drug resistance transporter 1) (Buxbaum 1999), měnit distribuci a farmakokinetiku těchto látek (Barrett *et al.* 2007). Tyto transportery totiž hrají roli ve vylučování cizorodých látek ledvinami a hematoencefalickou bariérou (Barret *et al.* 2007). Pokud tedy dojde k jejich inhibici, mohou léky přetrvávat déle v lidském organismu a snáze se kumulovat za hematoencefalickou bariérou v CNS.

Eflornithin je kombinován s pentamidinem, suraminem a melarsoprolem (WHO 1998). Melarsoprol může být kombinován s nifurtimoxem i berenilem (Bacchi 2009).

V klinických testech z roku 2006 (Priotto *et al.*) byly testovány 3 kombinace: melarsoprol s nifurtimoxem, melarsoprol s eflornithinem a nifurtimox s eflornithinem. Vyléčení byli dále kvůli relapsu sledováni 2 roky.

Nejlepších výsledků dosáhla kombinace nifurtimoxu s eflornithinem: všech 17 ze 17 testovaných pacientů bylo vyléčeno a nedošlo k relapsu. V kombinaci melarsoprolu s eflornithinem bylo bez relapsu vyléčeno 13 z 18 nemocných pacientů. Nejhorších výsledků dosáhla kombinace melarsoprolu a nifurtimoxu, při níž bylo bez relapsu vyléčeno pouhých 8 pacientů z 18 testovaných a testy kvůli ní byly i ukončeny. Je možné, že vysoká úspěšnost kombinace nifurtimoxu a eflornithinu tkví v synergickém působení na oxidativní stres buňky (Barrett *et al.* 2007).

4.4 Relaps onemocnění

Relaps se vyskytuje u 5-20% pacientů (WHO 1998). Detekce trypanosom po skončení léčby může nastat v důsledku chybné diagnostiky fáze onemocnění (diagnostika první fáze, přestože má pacient druhou fázi onemocnění) variabilní farmakokinetiky léků a reinfekce.

Pokud jsou trypanosomy detekovány po skončení léčby trypanosomiázy léky první fáze, je předpokládáno, že druhá fáze zůstala při první diagnostice neobjevena a je zahájena léčba preparáty pro druhou fázi onemocnění (WHO 1998).

Jestliže jsou trypanosomy nalezeny po léčbě melarsoprolem, je pacient doléčen eflornithinem či nifurtimoxem. Při relapsu onemocnění způsobeném *T. b. rhodesiense* je použit melarsoprol nebo nifurtimox.

4.5 Efektivita trypanocidních léků

Jediný lék vyvinutý na základě znalosti biochemického zacílení je eflornithin a ten byl nejdříve navrhnout pro léčbu rakoviny (Steverding 2010). V tomto ohledu jsou tedy zřejmě efektivnější empirické metody vývoje. Eflornithin je rovněž jediným lékem, vyvinutým proti spavé nemoci, za posledních 50 let (Barrett *et al.* 2007). Eflornithin je spolu s melarsoprolem a v menší míře i nifurtimoxem jednou z mála účinných látek vhodných pro léčbu druhé fáze onemocnění. Je sice méně toxický než melarsoprol, ale díky krátkému biologickému poločasu, je nutné časté podávání a léčba je tím pádem velmi drahá. Eflornithin rovněž neúčinkuje na většinu kmenů *T. b. rhodesiense*. Melarsoprol oproti tomu vykazuje vysokou míru toxicity a mnoho pacientů umírá v důsledku reaktivní encefalopatie.

Dalším problémem je vzrůstající rezistence vůči trypanocidním látkám, která je zřejmě způsobená mutacemi genů kódujících transportery (Mäser *et al.* 2003). Mutace mohou způsobit sníženou expresi těchto transporterů popř. nadměrnou expresi transporterů exportujících látky zpětně ven z buňky (ABC transportery).

Současné léky pro léčbu trypanosomiázy nejsou podávány perorálně, což značně komplikuje podávání v oblastech s nedostatečnou zdravotní péčí, které jsou spavou nemocí zasaženy (Wenzler *et al.* 2009; WHO 1998).

Většina modelových studií účinků léků na trypanosomy je prováděna na pro člověka nepatogenních druzích trypanosom (*T. brucei brucei*, *T. equiperdum*) a dalších modelových organismech (Carter et al. 1995; de Koning 2001; Shapiro *et al.* 1990). Mechanismy působení se tak u patogenních druhů mohou do různé míry lišit.

Problémem studií testujících statistickou úspěšnost léků je, stejně jako u diagnostiky, nízký počet zúčastněných (Priotto *et al.* 2006).

4.6 Vývoj nových léků

V současnosti probíhá *in vitro* i *in vivo* laboratorní testování trypanocidních látek, tedy potenciálních léků, ale neprobíhají žádné klinické testy na lidech.

4.6.1 DB289 - Puframidin maleát

Jedním z cílů výzkumu nových léků je vývoj léku, který by mohl být aplikován orálně (Wenzler et al. 2009). S vizí orální aplikace byl vyvíjen i tzv. DB75 neboli furamidin, který má velké množství antiparazitických účinků. Avšak právě orální podání je u aromatických diamidinů problém (kvůli pozitivně nabitým amidinovým skupinám způsobujícím nízkou vstřebatelnost látky), a tak byl lék zkonstruován ve formě neaktivní látky (DB289, pafuramidin maleát), která se stává aktivní až po vstřebání v žaludečním traktu. Při testování pro klinické použití se ale u některých pacientů objevily těžké poruchy jater a ledvin a testy DB289 byly zastaveny. Nyní jsou toxicita DB289 a nové diamidinové analogy dle Wenzlera *et al.* (2009) testovány na zvířecích modelech a v podmínkách *in vitro*.

4.6.2 Benzoxaborol

Po objevu kyseliny arylboronové jakožto kompetitivního inhibitoru serinových proteáz subtilisinu a chymotrypsinu (Phillip a Bender 1971), se v nynějších studiích (Jacobs *et al.* 2011) zkoumají další boronové deriváty, např. benzoxaborol. Boron má schopnost reagovat s hydroxylovou skupinou serinu v aktivním místě proteázy. Vývinu nových sloučenin obsahujících boron je věnována značná pozornost a jsou zkoumány účinky na různá infekční agens. Např. lék Velcade neboli bortezomid (jedna ze sloučenin boronu) inhibuje proteasom (organelu obsahující proteázy) a je již užíván pacienty při určitých typech rakoviny. Nasnadě je tedy i výzkum trypanocidních boronových sloučenin. V nedávné studii Jacobse *et al.* (2011) byla potvrzena trypanocidní aktivita některých benzoxaborolových sloučenin v *in vitro* a posléze *in vivo* modelech (první i druhá fáze trypanosomoiázy). Pro případné klinické použití musí být ještě provedeno mnoho dalších testů.

4.6.3 Azadipeptidové nitrily

V roce 2012 publikoval Yang *et al.* studii, ve které byly zkoumány sloučeniny obsahující azadipeptidové nitrily jako inhibitory cysteinové proteázy v *T. b. rhodesiense*. Všechny zkoumané sloučeniny vykazovaly trypanocidní aktivitu.

4.6.4 Trypanocidní aktivita přírodních látek

Tento rok byla publikována studie s trypanocidními (proti *T. b. brucei*) účinky chemických látek extrahovaných z rostliny *Artemisia elegantissima* (Rashid *et al.* 2014). Jako účinné se jevíly látky 3,4-dihydroxybonanzin a skopoletin.

Další nedávné *in vitro* výzkumy (rovněž s *T. b. brucei*) byly prováděny na některých fenolových sloučeninách a tzv. kawa laktonech obsažených v roslině *Piper methysticum* (Otoguro *et al.* 2012). Nejvyšší trypanocidní aktivitu, a to 122-175x vyšší než suramin a eflornithin, vykazoval β -fenethyl kafeát, dále farnesyl kafeát a nakonec dihydrokawain.

4.7 Vakcinace

Dosavadní pokusy o očkování nebyly příliš účinné a naopak zvyšovaly riziko reinfekce, neboť při opakovaném styku hostitelského organismu s parazitem docházelo k potlačení vrozené imunity imunitou získanou (Tabel *et al.* 2013). Tabel *et al.* (2013) se domnívá, že pro vývoj vakcíny je nutná indukce tvorby Th1 paměťových buněk. Pouhá intradermální imunizace tedy není dostačující a zřejmě by měla být spojena s aplikací dalších látek indukujících tvorbu Th1 paměťových buněk a podporujících vrozenou imunitu (inhibice arginázy a zvýšení indukovatelné NO syntázy v buňkách prezentujících antigen).

5 Závěr

V této práci jsou popsány dosud známé mechanismy cytotoxického působení trypanolytických faktorů 1 a 2 a rezistence *T. b. gambiense* a *rhodesiense* vůči těmto faktorům. Dále je rozebrána diagnostika a léčba trypanosomiázy, nemoci představující dlouhodobý, složitý a obtížně vyřešitelný problém.

Původci spavé nemoci jsou známi již více než sto let, a přesto není nemoc ani dostatečně pod kontrolou ani není dosud známo mnoho působících mechanismů.

Díky trypanolytickým faktorům obsaženým v lidském séru je člověk chráněn před zvířecími druhy trypanosom. *T. b. gambiense* a *rhodesiense* jsou vůči faktorům 1 a 2 rezistentní. Stěžejním faktem, jež spojuje oba faktory, je společná cytotoxická složka vyskytující se u obou faktorů: apolipoprotein L-I. Známé mechanismy rezistence obchází lytický efekt buď včasnou intracelulární interakcí s apolipoproteinem L-I (*T. b. rhodesiense*) nebo sníženým příjmem této látky (*T. b. gambiense*). Přesnější porozumění mechanismům rezistence by mohlo vést k vývoji nových typů léčiv.

Diagnostické metody byly v posledních 40 letech značně zdokonaleny a jejich použití je tak často omezeno pouze nízkými rozpočty zasažených oblastí. Velký pokrok do diagnostiky spavé nemoci přinesl vývoj aglutinačních testů (CATT), které jsou rychlé, jednoduché, levné a mohou být díky tomu použity pro masový screening. Pro přesnou diagnózu však musí být screeningem objevené pozitivní případy následně ověřeny některou z metod přímé diagnostiky. Tyto metody (mHCT, mAECT, QBC) vykazují uspokojivou senzitivitu a specifitu, nicméně vybavení k těmto metodám je příliš drahé. Navíc v chudých zasažených oblastech není často ani dostatečné množství kvalifikovaného personálu schopného metody provádět.

S léky je situace v subsaharské Africe ještě o poznání horší: jsou drahé, velmi toxické a vzrůstá proti nim rezistence. To lze zřejmě částečně vyřešit kombinacemi dosud známých léků (pentamidin, suramin, melarsoprol, eflornithin, nifurtimox), které často vykazují synergické účinky a mohou být proto podávány v menších dávkách, což rovněž brzdí selekci vůči léku a snižuje toxické účinky a cenu. Nicméně tyto kombinace jsou zatím pouze testovány v klinických studiích. Nabízí se samozřejmě i otázka vývoje nových léků. S rostoucími vědomostmi o metabolismu trypanosomy by mohly být zkonstruovány látky s přesným cytotoxickým cílem, avšak jediným lékem vyvinutým na základě znalosti buněčného zacílení byl eflornithin. Ten byl primárně vyvinut proti rakovině a působí pouze na *T. b. gambiense*. Dnes je zkoumáno množství nových látek prokazujících trypanocidní aktivitu (diamidinová analoga, boronové sloučeniny, azadipeptidové sloučeniny a látky izolované z některých rostlin). Trypanocidní aktivitu sice může vykazovat mnoho látek, největší problém však představuje toxicita vůči člověku, která je často objevena až v pozdních klinických testech, po mnoha letech vývoje. Další problém představuje biologický poločas, který je např. u eflornithinu velmi krátký (3h) a látka musí být proto podávána velmi často. Farmakokinetika léku je předem těžko odhadnutelná a je u každého jedince do jisté míry individuální. Osobně tak vidím nyní šanci spíše ve zdokonalení již zaběhnuté léčby pomocí kombinace několika léků, než ve vývoji nových léků.

6 Literatura

Aerts, D., P. Truc, L. Penchenier, Y. Claes and D. Le Ray (1992). A kit for in vitro isolation of trypanosomes in the field: first trial with sleeping sickness patients in the Congo Republic. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 86(4): 394-95.

Alsford, S., S. Eckert, N. Baker, L. Glover, A. Sanchez-Flores, K. F. Leung, D. J. Turner, M. C. Field, M. Berriman and D. Horn (2012). High-throughput decoding of anti-trypanosomal drug efficacy and resistance. *Nature* 482(7384): 232–36.

Alsford, S., M. C. Field and D. Horn (2013). Receptor-mediated endocytosis for drug delivery in African trypanosomes: fulfilling Paul Ehrlich's vision of chemotherapy. *Trends in Parasitology* 29(5): 207-12.

Ancelle, T., A. Paugam, F. Bourlioux, A. Merad, and J. P. Vigier (1997). Detection of trypanosomes in blood by the Quantitative Buffy Coat (QBC) technique: experimental evaluation. *Médecine tropicale* 57:245-48
cit. : Chappuis, F., L. Loutan, P. Simarro, V. Lejon and P. Büscher (2005). Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis. *Clinical Microbiology Review* 18(1): 133-46.

Bacchi, C. J. (2009). Chemotherapy of human african trypanosomiasis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* ID 195040.

Bailey, J. W. and D. H. Smith (1992). The use of the acridine orange QBC technique in the diagnosis of African trypanosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 86(6): 630.

Barrett, M. P., D. W. Boykin, R. Brun and R. R. Tidwell (2007). Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *British Journal of Pharmacology* 152(8): 1155-71.

Bitonti, A. J., J. A. Dumont and P. P. McCann (1986a). Characterization of *Trypanosoma brucei brucei* S-adenosyl-L-methionine decarboxylase and its inhibition by Berenil, pentamidine and methylglyoxal bis(guanylhydrazone). *The Biochemical journal* 237(3): 685-89.

Bitonti, A. J., P. P. McCann and A. Sjoerdsma (1986b). Necessity of antibody response in the treatment of African trypanosomiasis with alpha-difluoromethylornithine. *Biochemical pharmacology* 35(2): 331-34.

Bojanowski, K., S. Lelievre, J. Markovits, J. Couprie, A. Jacquemin-Sablon and A. K. Larsen (1992). Suramin is an inhibitor of DNA topoisomerase II in vitro and in Chinese hamster fibrosarcoma cells.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89(7): 3025-29.

Brun, R., J. Blum, F. Chappuis and C. Burri (2010). Human African trypanosomiasis. *Lancet* 375(9709): 148-59.

Buxbaum, E. (1999). Co-operative binding sites for transported substrates in the multiple drug resistance transporter Mdr1. *European journal of biochemistry* 265(1): 64-70.

Büscher P., E. Draelants, E. Magnus, T. Vervoort and N. Van Meirvenne (1991). An experimental latex agglutination test for antibody detection in human African trypanosomiasis. *Annales de la Société belge de médecine tropicale* 71(4): 267-73.

Büscher, P., V. Lejon, E. Magnus and N. Van Meirvenne (1999). Improved latex agglutination test for detection of antibodies in serum and cerebrospinal fluid of *Trypanosoma brucei gambiense* infected patients. *Acta Tropica* 73(1): 11-20.

Capewell P., N. J. Veitch, C. M. R. Turner, J. Raper, M. Berriman M, S. L. Hajduk and A. MacLeod (2011). Differences between *Trypanosoma brucei gambiense* Groups 1 and 2 in Their Resistance to Killing by Trypanolytic Factor 1. *PLoS neglected tropical diseases* 5(9): e1287.

Carter, N. S., B. J. Berger and A. H. Fairlamb (1995). Uptake of diamidine drugs by the P2 nucleoside transporter in melarsen-sensitive and -resistant *Trypanosoma brucei brucei*. *The Journal of biological chemistry* 270(47): 28153-57.

De Koning, H. P. (2001). Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by three distinct transporters: implications for cross-resistance with arsenicals. *Molecular pharmacology* 59(3): 586-92.

Dukes P., W. C. Gibson, J. K. Gashumba, K. M. Hudson, T. J. Bromidge, A. Kaukus, T. Asonganyi and E. Magnus (1992). Absence of the LiTat 1.3 (CATT antigen) gene in *Trypanosoma brucei gambiense* stocks from Cameroon. *Acta Tropica* 51(2): 123-34.

Enyaru, J. C., E. Matovu, B. Nerima, M. Akol and C. Sebikali (2006). Detection of *T. b. rhodesiense* trypanosomes in humans and domestic animals in south east Uganda by amplification of serum resistance-associated gene. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1081: 311-19.

Fairlamb, A. H., G. B. Henderson, C. J. Bacchi and A. Cerami (1987). In vivo effects of difluoromethylornithine on trypanothione and polyamine levels in bloodstream forms of *Trypanosoma*

brucei. *Molecular and biochemical parasitology* 24(2): 185-91.

Field, M. C. and M. Carrington (2009). The trypanosome flagellar pocket. *Nature reviews. Microbiology* 7(11), 775-86.

Gritli-Linde, A., U. Björkman, U. Delle, L. Frostesjö, R. Hultborn, K. Hultén, B. R. Johansson, U. Nannmark and A. Linde (1998). Effects of suramin on polyamine metabolism in B16 murine melanoma cells. *Anticancer research* 18(2A): 855-62.

Hanau, S., M. Ripa, M. Bertelli, F. Dallochio and M. P. Barrett (1996). 6-Phosphogluconate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei*. Kinetic analysis and inhibition by trypanocidal drugs. *European journal of biochemistry* 240(3): 592-99.

Chappuis, F., L. Loutan, P. Simarro, V. Lejon and P. Büscher (2005). Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis. *Clinical microbiology reviews* 18(1): 133-46.

Iten, M., H. Mett, A. Evans, J. C. Enyaru, R. Brun and R. Kaminsky (1997). Alterations in ornithine decarboxylase characteristics account for tolerance of *Trypanosoma brucei rhodesiense* to D,L-alpha-difluoromethylornithine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(9): 1922-25.

Jacobs, R. T., J. J. Plattner, B. Nare, S. A. Wring, D. Chen, Y. Freund, E. G. Gaukel, M. D. Orr, J. B. Perales, M. Jenks, R. A. Noe, J. M. Sligar, Y. K. Zhang, C. J. Bacchi, N. Yarlett and R. Don (2011). Benzoxaboroles: a new class of potential drugs for human African trypanosomiasis. *Future medicinal chemistry* 3(10): 1259-78.

Kennedy P. G. E. (1999). The pathogenesis and modulation of the post-treatment reactive encephalopathy in a mouse model of Human African Trypanosomiasis. *Journal of Neuroimmunology* 100: 36-41.

Kieft, R., P. Capewell, C. M. Turner, N. J. Veitch, A. MacLeod and S. Hajduk (2010). Mechanism of *Trypanosoma brucei gambiense* (group 1) resistance to human trypanosome lytic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(37), 16137-41.

Krieger, S., W. Schwarz, M. R. Ariyanayagam, A. H. Fairlamb, R. L. Krauth-Siegel and C. Clayton (2000). Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Molecular microbiology* 35(3): 542-52.

- Lumsden, W. H., C. D. Kimber, D. A. Evans and S. J. Doig (1979). Trypanosoma brucei: Miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias: Adaptation for field use. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(3): 312-17.
- Magnus E, T. Vervoort and N. Van Meirvenne (1978). A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of T. b. gambiense trypanosomiasis. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale* 58(3): 169-76.
- Mahon, C. and G. Manuselis (2000). *Textbook of diagnostic microbiology*. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000, xxix, 1234 s.
- Malvy, D. and F. Chappuis (2011) Sleeping sickness. *Clinical microbiology and infection* 17(7): 986-95.
- Molina-Portela, M. E. P., E. B. Lugli, E. Recio-Pinto and J. Raper (2005). Trypanosome lytic factor, a subclass of high-density lipoprotein, forms cation-selective pores in membranes. *Molecular and biochemical parasitology*, 144(2): 218-26.
- Munday, J. C., A. A. Eze, N. Baker, L. Glover C. Clucas, D. Aguinaga Andrés, M. J. Natto, I. A. Teka, J. McDonald, R. S. Lee, F. E. Graf, P. Ludin, R. J. S. Burchmore, C. M. R. Turner, A. Tait, A. MacLeod, P. Mäser, M. P. Barrett, D. Horn and H. P. De Koning (2014). Trypanosoma brucei aquaglyceroporin 2 is a high-affinity transporter for pentamidine and melaminophenyl arsenic drugs and the main genetic determinant of resistance to these drugs. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 69(3): 651-63.
- Mäser, P., A. Lüscher and R. Kaminsky (2003). Drug transport and drug resistance in African trypanosomes. *Drug resistance updates* 6(5): 281-90.
- Nantulya, V. M. (1997). TrypTect CIATT--a card indirect agglutination trypanosomiasis test for diagnosis of Trypanosoma brucei gambiense and T. b. rhodesiense infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 91(5): 551-53.
- Nishimura, K., T. Yanase, N. Araki, Y. Ohnishi, S. Kozaki, K. Shima, M. Asakura, W. Samosomsuk and S. Yamasaki (2006). Effects of polyamines on two strains of Trypanosoma brucei in infected rats and in vitro culture. *The Journal of parasitology* 92(2): 211-17.
- Noireau, F., J. L. Lemesre, M. Y. Nzoukoudi, M. T. Louembet, J. P. Gouteux and J. L. Frezil (1988). Serodiagnosis of sleeping sickness in the Republic of the Congo: comparison of indirect immunofluorescent antibody test and card agglutination test. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and*

Hygiene 82(2): 237-40.

Noireau, F., P. Force-Barge and P. Cattand (1991). Evaluation of Testryp CATT applied to samples of dried blood for the diagnosis of sleeping sickness. *Bulletin of the World Health Organization* 69(5): 603-08.

Otoguro, K., M. Iwatsuki, A. Ishiyama, M. Namatame, Nishihara-Tsukashima A, H. Kiyohara, T. Hashimoto, Y. Asakawa, S. Omura and H. Yamada (2012). In vitro antitrypanosomal activity of some phenolic compounds from propolis and lactones from Fijian Kava (*Piper methysticum*). *Journal of natural medicines* 66(3): 558-61.

Philipp, M. and M. L. Bender (1971). Inhibition of serine proteases by arylboronic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68(2): 478-80.

Picozzi, K., E. M. Fèvre, M. Odiit, M. Carrington, M. C. Eisler, I. Maudlin and S. C. Welburn (2005). Sleeping sickness in Uganda: a thin line between two fatal diseases. *BMJ : British medical journal* 331(7527): 1238-41.

Priotto, G., C. Fogg, M. Balasegaram, O. Erphas, A. Louga, F. Checchi, S. Ghabri and P. Piola (2006). Three drug combinations for late-stage *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness: a randomized clinical trial in Uganda. *PLoS clinical trials* 1(8): e39.

Raper, J., R. Fung, J. Ghiso, V. Nussenzweig and S. Tomlinson (1999). Characterization of a novel trypanosome lytic factor from human serum. *Infection and immunity* 67(4): 1910-16.

Rashid, M. U., S. Ali, M. Alamzeb, J. Igoli, C. Clements, S. Q. Shah, V. A. Ferro, A. I. Gray and M. R. Khan (2014). Phytochemical and antitrypanosomal investigation of the fractions and compounds isolated from *Artemisia elegantissima*. *Pharmaceutical biology* 16.

Rifkin, M. R. (1978). Identification of the trypanocidal factor in normal human serum: high density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75(7): 3450-54.

Robays, J., M. M. Bilengue, P. Van der Stuyft and M. Boelaert (2004). The effectiveness of active population screening and treatment for sleeping sickness control in the Democratic Republic of Congo. *Tropical medicine & international health* 9(5): 542-50.

Roberts, S. C., J. Scott, J. E. Gasteier, Y. Jiang, B. Brooks, A. Jardim, N. S. Carter, O. Heby and B. Ullman

(2002). S-adenosylmethionine decarboxylase from *Leishmania donovani*. Molecular, genetic, and biochemical characterization of null mutants and overproducers. *The Journal of biological chemistry* 277(8): 5902-09.

Sanjay K. Shahi, R. Luise Krauth-Siegel and Christine E. Clayton (2002). Overexpression of the putative thiol conjugate transporter Tb MRPA causes melarsoprol resistance in *Trypanosoma brucei*. *Molecular Microbiology* 43(5): 1129–38.

Shapiro, T. A. and P. T. Englund (1990). Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(3): 950-54.

Simarro, P. P., J. Jannin and P. Cattand (2008). Eliminating human African trypanosomiasis: where do we stand and what comes next? *PLoS medicine* 5(2): e55.

Simarro, P. P., A. Diarra, J. A. Ruiz Postigo, J. R. Franco (2011). The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health organization 2000-2009: the way forward. *PLoS neglected tropical diseases* 5(2): e1007.

Simarro P. P., G. Cecchi, J. R. Franco, M. Paone, A. Diarra, J. A. Ruiz-Postigo, E. M. Fèvre, R. C. Mattioli and J. G. Jannin (2012). Estimating and Mapping the Population at Risk of Sleeping Sickness. *PLoS neglected tropical diseases* 6(10): e1859.

Simarro, P. P., J. R. Franco, A. Diarra, J. A. Ruiz Postigo and J. Jannin (2013). Diversity of human African trypanosomiasis epidemiological settings requires fine-tuning control strategies to facilitate disease elimination. *Research & Reports in Tropical Medicine* 4: p1

Sina, G. C., N. Triolo, B. Cramet and M. Suh Bandu (1982). [Adrenaline in the prevention and treatment of adverse effects of arsobal therapy. Apropos of 776 cases of human African trypanosomiasis caused by *T. gambiense* in the Health Service of Fontem (U.R. Cameroon)]. *Médecine tropicale* 42(5): 531-36.

Stephens, N. A. and S. L. Hajduk (2011). Endosomal localization of the serum resistance-associated protein in African trypanosomes confers human infectivity. *Eukaryotic Cell* 10(8): 1023-33.

Steverding, D. (2010). The development of drugs for treatment of sleeping sickness: a historical review. *Parasites & vectors* 3(1): 15.

- Stewart, M. L., S. Krishna, R. J. Burchmore, R. Brun, H. P. de Koning, D. W. Boykin, R. R. Tidwell, J. E. Hall and M. P. Barrett (2005). Detection of arsenical drug resistance in *Trypanosoma brucei* with a simple fluorescence test. *Lancet* 366(9484): 486-87.
- Symula, R. E., J. S. Beadell, M. Sstrom, K. Agbebakun O. Balmer, W. Gibson, S. Aksoy and A. Caccone (2012). *Trypanosoma brucei* gambiense group 1 is distinguished by a unique amino acid substitution in the HpHb receptor implicated in human serum resistance. *PLoS neglected tropical diseases* 6(7): e1728.
- Tabel, H., G. Wei and H. J. Bull (2013). Immunosuppression: cause for failures of vaccines against African Trypanosomiasis. *PLoS neglected tropical diseases* 7(3): e2090.
- Truc, P., J. W. Bailey, F. Doua, C. Laveissière and D. G. Godfrey (1994). A comparison of parasitological methods for the diagnosis of gambian trypanosomiasis in an area of low endemicity in Côte d'Ivoire. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88(4): 419-21.
- Truc, P., V. Jamonneau, P. N'guessan, P. B. Diallo and A. Garcia (1998). Parasitological diagnosis of human African trypanosomiasis: a comparison of the OBC and miniature anion-exchange centrifugation techniques. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 92(3): 288-89.
- Truc, P., V. Jamonneau, G. Cuny and J. L. Frézil (1999). Use of polymerase chain reaction in human African trypanosomiasis stage determination and follow-up. *Bulletin of the World Health Organization* 77(9): 745-48.
- Truc, P., V. Lejon, E. Magnus, V. Jamonneau, A. Nangouma, D. Verloo, L. Penchenier and P. Büscher (2002). Evaluation of the micro-CATT, CATT/*Trypanosoma brucei* gambiense, and LATEX/T b gambiense methods for serodiagnosis and surveillance of human African trypanosomiasis in West and Central Africa. *Bulletin of the World Health Organization* 80(11): 882-86.
- Truc, P., A. Lando, L. Penchenier, G. Vatunga and T. Josenando (2012). Human African trypanosomiasis in Angola: clinical observations, treatment, and use of PCR for stage determination of early stage of the disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 106(1): 10-14.
- Turner, C. M., J. D. Barry and K. Vickerman (1988). Loss of variable antigen during transformation of *Trypanosoma brucei* rhodesiense from bloodstream to procyclic forms in the tsetse fly. *Parasitology research* 74(6): 507-11.

- Van Den Abbeele, J., Y. Claes, D. Van Bockstaele, D. Le Ray and M. Coosemans (1999). Trypanosoma brucei spp. development in the tsetse fly: characterization of the post-mesocyclic stages in the foregut and proboscis. *Parasitology* 118 (Pt 5): 469-78.
- Van Meirvenne, N. (1992). Diagnosis of human African trypanosomiasis. *Annales de la Société belge de médecine tropicale* 72(Suppl 1): 53-56.
- Vanhamme, L. and E. Pays (2004). The trypanosome lytic factor of human serum and the molecular basis of sleeping sickness. *International journal for parasitology* 34(8): 887-98.
- Vanhollebeke, B., G. De Muylder, M. J. Nielsen, A. Pays, P. Tebabi, M. Dieu, M. Raes, S. K. Moestrup and E. Pays (2008). A haptoglobin-hemoglobin receptor conveys innate immunity to Trypanosoma brucei in humans. *Science* 320(5876): 677-81.
- Vanhollebeke, B. and E. Pays (2010). The trypanolytic factor of human serum: many ways to enter the parasite, a single way to kill. *Molecular microbiology* 76(4): 806-14.
- Wenzler, T., D. W. Boykin, M. A. Ismail, J. E. Hall, R. R. Tidwell and T. Brun (2009). New treatment option for second-stage African sleeping sickness: in vitro and in vivo efficacy of aza analogs of DB289. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53(10): 4185-92.
- Wery, M., S. Wery-Paskoff and N. Van Wettere (1970). The diagnosis of human African trypanosomiasis (T. gambiense) by the use of fluorescent antibody test. I. Standardization of an easy technique to be used in mass surveys. *Annales des sociétés belges de médecine tropicale, de parasitologie, et de mycologie* 50(5): 613-34.
- WHO (1998). Control and surveillance of African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Technical Report Series* 881: I-VI, 1-114.
- Woo, P. T. (1970). The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Tropica* 27(4): 384-86.
- Xong, H. V., L. Vanhamme, M. Chamekh, C. E. Chimfwembe, J. Van Den Abbeele, A. Pays, N. Van Meirvenne, R. Hamers, P. De Baetselier and E. Pays (1998). A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in Trypanosoma rhodesiense. *Cell* 95(6): 839-46.
- Yang, P. Y., M. Wangi, L. LI, H. Wu, C. Y. He and S. Q. Yao (2012). Design, synthesis and biological evaluation of potent azadipeptide nitrile inhibitors and activity-based probes as promising anti-Trypanosoma

brucei agents. *Chemistry* 18(21): 6528-41.

Zillmann, U., S. M. Konstantinov, M. R. Berger and R. Braun (1996). Improved performance of the anion-exchange centrifugation technique for studies with human infective African trypanosomes. *Acta Tropica* 62(3): 183-87.