

Eine einfache Methode zur Bestimmung der mikrofilariziden Wirkung von Substanzen bei Nagetierfilariosen*)

Sabine Arndt, E. Barthold, H. Schulz-Key

Einleitung

Die Filarien des Menschen zeichnen sich durch eine strenge Wirtsspezifität aus und lassen sich nur in Ausnahmefällen auf Labortiere übertragen. Für die Erprobung von neuen Medikamenten zieht man daher verwandte Filarienarten heran, die in Nagetieren parasitieren. Sie eignen sich für die Beurteilung der Wirksamkeit von anthelmintischen Substanzen jedoch nur bedingt, da die meisten Substanzen ein begrenztes wirts- oder parasitenspezifisches Wirkungsspektrum haben. So läßt sich aus der filariziden Wirksamkeit einer Substanz in einem Tierexperiment nicht automatisch auf ihre Eignung für die Behandlung der Filariosen des Menschen schließen. Es ist daher wesentlich, ein größeres Spektrum an Tierfilarien für Chemotherapieversuche zur Verfügung zu haben und die dafür notwendigen Techniken zu entwickeln. Die aufwendige Zyklushaltung und die lange präpatente Phase bei Filarieninfektionen schränken jedoch Experimente in großen Serien ein. Wir wollen daher eine einfache Methode vorstellen, die eine schnellere Beurteilung der Wirkung von filariziden Substanzen erlaubt.

Wir untersuchen in unserem Labor seit einiger Zeit das neue Anthelmintikum Ivermectin (Mectizan®), ein höchst wirksames Medikament medizinischer und veterinärmedizinischer Bedeutung. Bei der Behandlung von Filariosen wirkt es meist nur mikrofilarizid, d. h. es kann lediglich die Mikrofilarien abtöten, während die adulten Filarien meist ungeschädigt bleiben und weiterhin Mikrofilarien freisetzen können. Die wirksame Dosis von Ivermectin ist im Vergleich zu anderen Medikamenten auffallend klein und der genaue Wirkungsmechanismus bei der Eliminierung von Mikrofilarien nicht genau bekannt. Einige Anzeichen sprechen dafür, daß das Ivermectin nicht direkt, sondern über einen Synergismus des Immunsystems des Wirts auf den Parasiten wirkt (1, 2). Dieses Medikament haben wir für die Entwicklung unserer neuen Technik gegen *Acanthocheilonema viteae* in *Meriones unguiculatus* eingesetzt und haben dabei gleichzeitig weitere Hinweise auf den vermuteten Synergismus des Wirts bei der Medikamentenwirkung erhalten.

*) Mit Unterstützung der Kommission der Europäischen Gemeinschaft (Vertrag Nr. TS3-CT 91-0037) und BOEHRINGER INGELHEIM.

Material und Methoden

Infektion von *Meriones unguiculatus* mit *Acanthocheilonema viteae*

Je 60 infektiöse Larven von *A. viteae* wurden in die vordere Extremität von *M. unguiculatus* inokuliert. Nach etwa acht Wochen traten die ersten Mikrofilarien im peripheren Blut der Wirtstiere auf. Die Mikrofilariendichten wurden in retroorbital entnommenem Blut nach Lyse der Erythrozyten in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt.

Behandlung von patenten *Meriones* mit Ivermectin

Patente Tiere mit einer Mikrofilarämie von mehr als 100 Mikrofilarien/ μ l Blut erhielten eine einmalige intraperitoneale Dosis von 200 μ g Ivermectin/kg Körpergewicht. Die Bestimmung der Mikrofilariendichten im zirkulierenden Blut erfolgte in verschiedenen Abständen zwischen drei Stunden und acht Wochen nach Behandlung (Abb. 1). Einige Tiere wurden obduziert, um auch eine Wirkung von Ivermectin auf die adulten Filarien beurteilen zu können.

Subkutane Inokulation von Mikrofilarien in naive *M. unguiculatus*

Mikrofilarien wurden aus dem Blut von patenten *Meriones* gewonnen, jeweils 250.000 subkutan in die vordere Extremität von naiven, d. h. nichtinfizierten *Meriones* inokuliert und ihr Erscheinen und Persistieren im zirkulierenden Blut verfolgt (Abb. 2). Um die Dauer der Wirksamkeit von Ivermectin zu bestimmen und Hinweise auf dessen Bioverfügbarkeit zu erhalten, wurden in einer zweiten Versuchsreihe naive Tiere mit 200 μ g Ivermectin/kg Körpergewicht behandelt, bevor ihnen nach verschiedenen langen Abständen Mikrofilarien inokuliert wurden. Dies geschah unmittelbar nach Medikamentengabe oder erst nach 2, 4, 8, 15 bzw. 28 Tagen.

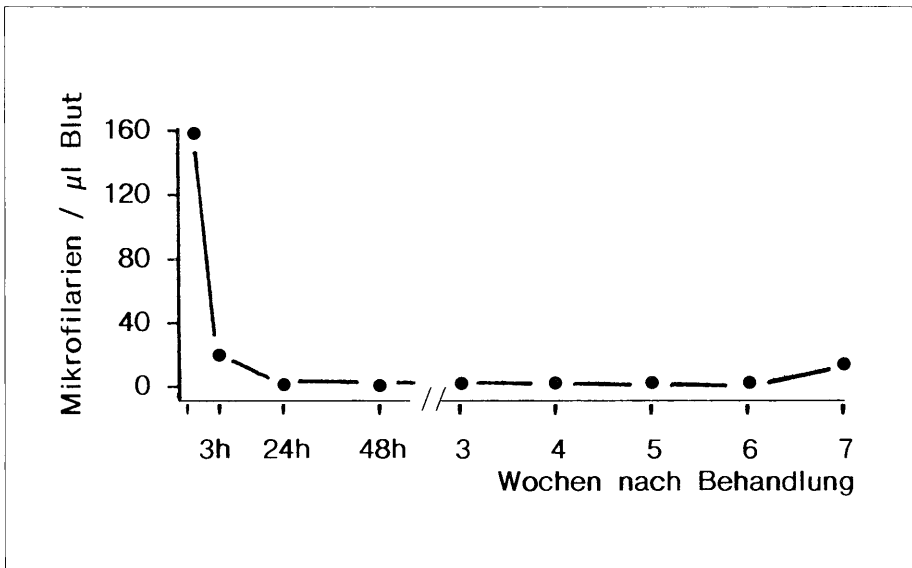


Abb. 1:

Veränderungen von Mikrofilariendichten von *A. viteae* in *M. unguiculatus* nach einmaliger Behandlung mit Ivermectin.

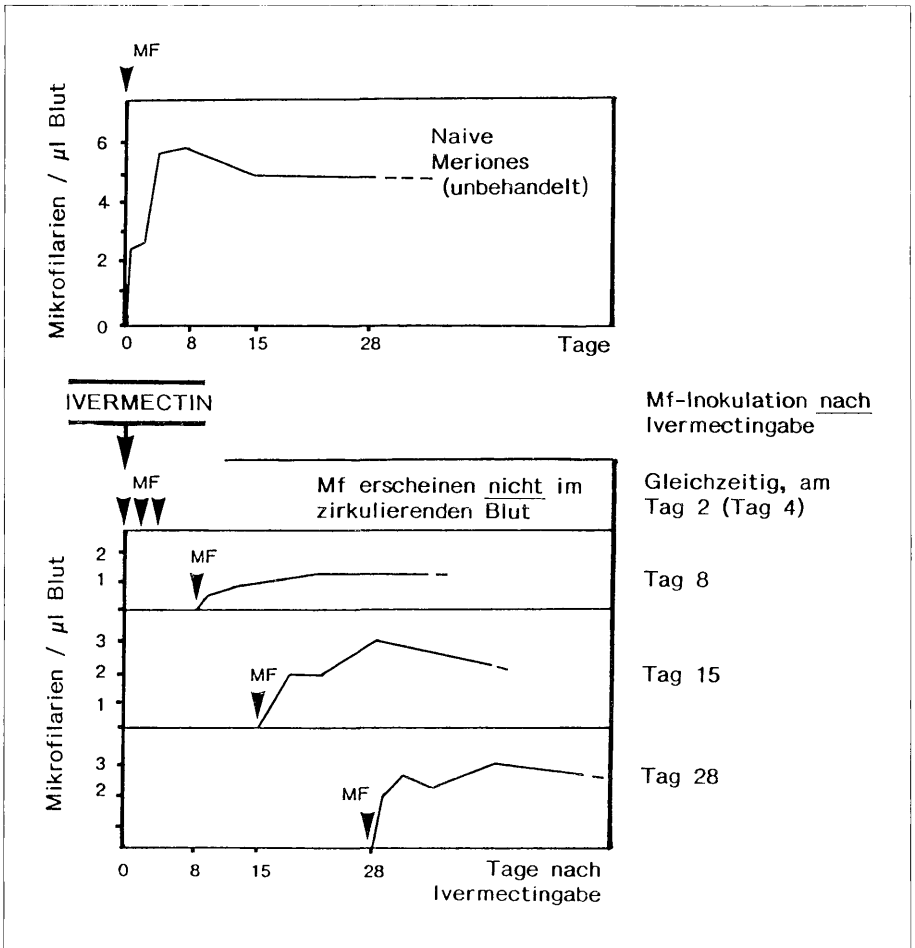


Abb. 2:

Inokulation von *A. viteae*-Mikrofilarien in naive *M. unguiculatus*. Erscheinen der Mikrofilarien im zirkulierenden Blut in naiven unbehandelten Wirtstieren (oben) oder in Tieren, die vorher mit 200 µg Ivermectin/kg Körpergewicht behandelt worden waren (unten).

Ergebnisse

Wirkung von Ivermectin auf *A. viteae* in patenten Infektionen

Schon drei Stunden nach Ivermectingabe waren 80% der Mikrofilarien aus dem zirkulierenden Blut verschwunden. Nach 24 Stunden waren sie dort nicht mehr nachweisbar (Abb.1). Weder im Mikrofilarienreservoir in der Lunge noch in den Organen eines Tieres, das 24 Stunden nach Behandlung obduziert wurde, konnten Mikrofilarien oder deren Reste nachgewiesen werden, d. h. die Parasitenlarven waren vom Wirt quantitativ eliminiert worden. Die adulten Filarien zeigten zu diesem frühen Zeitpunkt keinerlei Schädigungen und auch die embryonalen Entwicklungsstadien in den Uteri zeigten keine auffälligen Veränderungen. Bei der Obduktion von behandelten Tieren acht Wochen nach Behandlung wurde jedoch nur noch ein Viertel der sonst üblichen Wurm-last gefunden. Die Würmer waren teilweise eingekapselt, die Zahl der intrauterinen

Entwicklungsstadien war deutlich verringert, viele von ihnen auch pathologisch verändert.

Fünf von acht Tieren zeigten am Tage nach der Behandlung schwere Nebenwirkungen, drei von ihnen starben innerhalb von 48 Stunden.

Inokulation von Mikrofilarien in naive Tiere

— Verteilung der Mikrofilarien im Wirt

Ein Drittel der Mikrofilarien, die subkutan in naive *Meriones* inokuliert waren, erschienen innerhalb von zwei Tagen im zirkulierenden Blut (Abb. 2). Die Mikrofilariendichten blieben über mehrere Wochen stabil und nahmen danach allmählich ab.

— Verhalten der Mikrofilarien bei gleichzeitiger oder vorausgegangener Ivermectinbehandlung

Mikrofilarien erschienen nicht im Blut, wenn sie gleichzeitig oder zwei Tage nach vorausgegangener Ivermectinbehandlung inokuliert worden waren (Abb. 2). In einigen Tieren wurden wenige Mikrofilarien gefunden, wenn seit der Ivermectingabe mindestens vier Tage verstrichen waren. Bei einem Abstand zur medikamentösen Behandlung von acht Tagen hatten alle Tiere Mikrofilarien im Blut. Je länger die Ivermectingabe zurücklag, desto mehr Mikrofilarien waren nach einer Inokulation im Blut nachweisbar. Ihre Dichten blieben jedoch auch bei einem Abstand zur Ivermectingabe von 28 Tagen signifikant hinter denen unbehandelter Tiere zurück.

Diskussion

Mikrofilarien von *A. viteae* in *Meriones* werden durch eine Behandlung mit Ivermectin offenbar innerhalb weniger Stunden quantitativ aus dem Wirt eliminiert. Eine makrofilarizide Wirkung, d. h. eine Wirkung auf den adulten Parasiten, ist anfangs nicht zu erkennen, wie die Obduktion einen Tag nach Behandlung ergab. Dennoch deutet der Rückgang der Wurmlast am Ende des Versuches auf eine verspätete makrofilarizide Wirkung der Behandlung. Die in unseren Tieren beobachtete Einkapselung der Würmer finden wir regelmäßig auch bei postpatent gewordenen, unbehandelten Infektionen, wenn die Mikrofilarien bereits aus der Zirkulation verschwunden, einige adulte Filarien aber noch vorhanden sind. Die Würmer befinden sich bei der dynamischen Balance zwischen Parasit und Wirt auf dem Rückzug und können in dieser Phase einer stärker werdenden Wirtsabwehr offenbar nicht mehr standhalten.

Nach wenigen Tagen bis Wochen ist Ivermectin im Wirt nicht mehr nachzuweisen, d. h. für die lange Unterdrückung der Parasitämie und die Einkapselung der adulten Würmer müssen andere Faktoren herangezogen werden. So könnte hierfür eine verstärkte Immunantwort verantwortlich gemacht werden, die durch die Ivermectinbehandlung eingeleitet wird und die Parasit-Wirt-Balance beeinflusst. Bei der Behandlung der Onchozerkose vermuten wir ähnliche synergistische Wechselwirkungen von Medikamentengabe und Wirtsfaktoren und sprechen hier von einer "drug-facilitated immunity" (1).

Die Inokulation von Mikrofilarien in naive Wirtstiere verkürzt die Versuchsvorbereitung für ein Medikamentenscreening erheblich, da die lange Phase bis zum Erreichen der Patenz und dem Auftreten geeigneter Mikrofilariendichten übersprungen werden kann. Ein Experiment mit einem solchen Tier kann natürlich nur die mikrofilarizide Wirkung einer Substanz nachweisen. Auch bleiben wichtige immunologische Vorgänge im Wirt, wie sie bei einer natürlichen Infektion während der Präpatenz und Patenz ablaufen, teilweise aus. Immunologische Faktoren können jedoch bei der medikamentösen Eliminie-

rung von Mikrofilarien eine entscheidende Rolle spielen (2). Dennoch bietet ein solches Screening-Experiment deutliche Vorteile gegenüber einem reinen *in vitro*-Test, da wichtige pharmakologische Faktoren wie die Bioverfügbarkeit und Wirtsfaktoren in den Versuch eingehen. Ein Test mit unserer Methode ist daher zwischen dem eigentlichen *in vivo*- und *in vitro*-Test anzuordnen und liefert schnelle, orientierende Ergebnisse.

Der Wirkungsmechanismus von Ivermectin bei der Eliminierung von Mikrofilarien im Wirt bleibt weiterhin unklar. Bemerkenswerterweise werden Mikrofilarien nach Inokulation in naive, vorbehandelte Tiere teilweise auch dann noch eliminiert, wenn das Medikament im Wirt schon längst nicht mehr nachzuweisen ist und somit nicht wirksam werden dürfte. Dies ist ein weiterer Hinweis auf Veränderungen von Wirtsfaktoren nach Ivermectingabe und einen Synergismus des Wirts bei der Wirkung des Medikaments auf Filarien, der weiter untersucht werden müsste.

Zusammenfassung

Die Wirkung von Ivermectin auf die Filarie *Acanthocheilonema viteae* in *Meriones unguiculatus* wurde untersucht. Schon wenige Stunden nach Ivermectingabe sind alle Mikrofilarien aus dem zirkulierenden Blut und allen Organen des Wirts entfernt. Neue Mikrofilarien treten nach acht Wochen teilweise wieder auf. Zu diesem Zeitpunkt ist die Anzahl der adulten Filarien stark reduziert. Teilweise sind sie eingekapselt wie bei postpatenten Infektionen und die durchschnittliche Zahl ihrer intrauterinen Entwicklungsstadien geht deutlich zurück. Mikrofilarien, die subkutan in naive *Meriones* inokuliert werden, erscheinen nach zwei Tagen zu einem Drittel im zirkulierenden Blut. Werden Mikrofilarien in naive Tiere inokuliert, die zwei Tage zuvor oder gleichzeitig mit Ivermectin behandelt wurden, erscheinen solche Mikrofilarien nicht. Erst bei längeren Abständen zur vorausgegangenen Ivermectingabe erscheinen inokulierte Mikrofilarien zunehmend in der Zirkulation, aber auch bei einem Intervall von 28 Tagen immer noch in geringerer Anzahl als in unbehandelten Tieren. Wegen der kurzen Halbwertszeit von Ivermectin in den Tieren werden synergistische Wirtsfaktoren für die lange Wirkung von Ivermectin mitverantwortlich gemacht.

Schlüsselwörter

Medikamentenscreening, Ivermectin, filarizide Wirkung.

Summary

A simple technic to assess microfilaricidal efficacy of drugs in rodent filariases

Patent infections of *Acanthocheilonema viteae* in *Meriones unguiculatus* were treated with a single dose of ivermectin. Microfilariae were cleared from peripheral blood and internal organs within few hours. New microfilariae appeared in the blood after 8 weeks only. The adult worm load was reduced when animals were autopsied after two months. Several worms were encapsulated as found in postpatent infections. Most embryonic stages were pathologically altered and their total number was reduced. One third of microfilariae inoculated into naive *Meriones* appeared in peripheral blood within two days. In order to assess the duration of drug effect in the host naive *Meriones* were treated with ivermectin simultaneously or 2, 4, 8, 15 or 28 days prior inoculation of microfilariae. Microfilariae appeared in peripheral blood only if the interval between drug administration and inoculation of microfilariae correlated positively with the interval of inoculation. However, inspite of the short half live of ivermectin in the host

the rate of inoculated microfilariae appearing in the circulation was reduced even after an interval of 28 days compared to untreated animals. It is suggested that synergistic host factors contribute to the long term effects of ivermectin treatment.

Key words

Screening, ivermectin, filaricidal efficacy.

Literatur

1. SCHULZ-KEY, H., SOBOSLAY, P. T., HOFFMANN, W. H. (1992):
Ivermectin-facilitated immunity.
Parasitology Today 8, 152-153.
2. JÜRGENS, S., SCHULZ-KEY, H. (1990):
Effect of ivermectin on the vertical distribution of *Onchocerca volvulus* microfilariae in the skin.
Trop. Med. Parasit. 41, 165-168.

KORRESPONDENZADRESSE:

Priv. Doz. Dr. Hartwig Schulz-Key
Tropenmed. Institut
Universität Tübingen

Wilhelmstraße 31
D-W 7400 Tübingen · Bundesrepublik Deutschland

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1992

Band/Volume: [14](#)

Autor(en)/Author(s): Arndt Sabine, Barthold E., Schulz-Key Hartwig

Artikel/Article: [Eine einfache Methode zur Bestimmung der mikrofilariziden Wirkung von Substanzen bei Nagetierfilariosen. 33-38](#)