

Höhenzonierte Mikrofilarienverteilung (*Onchocerca volvulus*) in der Haut von Onchozerkosepatienten nach Behandlung mit Ivermectin

S. Jürgens, H. Schulz-Key

Einleitung

Zur Behandlung der Onchozerkose wird seit kurzem Ivermectin, ein Fermentationsprodukt von *Streptomyces avermitilis*, erfolgreich eingesetzt. Nach Verabreichung einer einmaligen oralen Dosis schlüpfen in physiologischer Kochsalzlösung nur noch sehr wenige Mikrofilarien aus den entnommenen Hautproben aus, was auf eine wirksame Eliminierung der Mikrofilarien hindeutet (1, 9, 11). Es ist jedoch bis jetzt offen geblieben, was mit den Mikrofilarien tatsächlich geschieht, ob sie in der Haut durch die Ivermectin-Behandlung abgetötet und abgebaut werden, oder ob sie in tiefere Hautschichten abwandern.

Um diese Frage zu beantworten, haben wir zunächst die Mikrofilariendichten in verschiedenen Hauttiefen unbehandelter Patienten ermittelt und dann mit den Werten Ivermectin-behandelter Patienten verglichen. Gleichzeitig wurde der Anteil degenerativ veränderter Mikrofilarien anhand morphologischer Kriterien bestimmt.

Material und Methoden

Patientenkollektiv

Für die folgenden Untersuchungen wurden Hautbiopsien von 33 mittel bis stark infizierten Onchozerkosepatienten in Zentral-Togo verwendet, die in einer doppelt blind durchgeführten Behandlung eine einmalige orale Dosis von 0 µg (Plazebo) oder 100 - 200 µg Ivermectin/kg Körpergewicht erhalten hatten.

Entnahme und Behandlung der Proben

Bei der Exstirpation von Onchozerkoseknoten 2, 4 oder 28 Tage nach Behandlung wurde routinemäßig ein schmaler Hautkeil vom Wundrand reseziert (Wundrandbiopsie), in einem Äthanol-Glyzerin-H₂O dest.-Gemisch (50 : 10 : 40) fixiert und aufbewahrt. Vor der Aufarbeitung wurden sie über 24 Stunden mehrfach in PBS (phosphate buffered saline nach Sörensen) gewaschen. Von der Wundrandbiopsie wurden je vier Hautzylinder in 1, 2, 3 und 5 mm Tiefe horizontal zur Hautoberfläche mit Hohlmessern (Hornhauttrephinen von 1 oder 2 mm Durchmesser, [Abb. 1]) ausge-

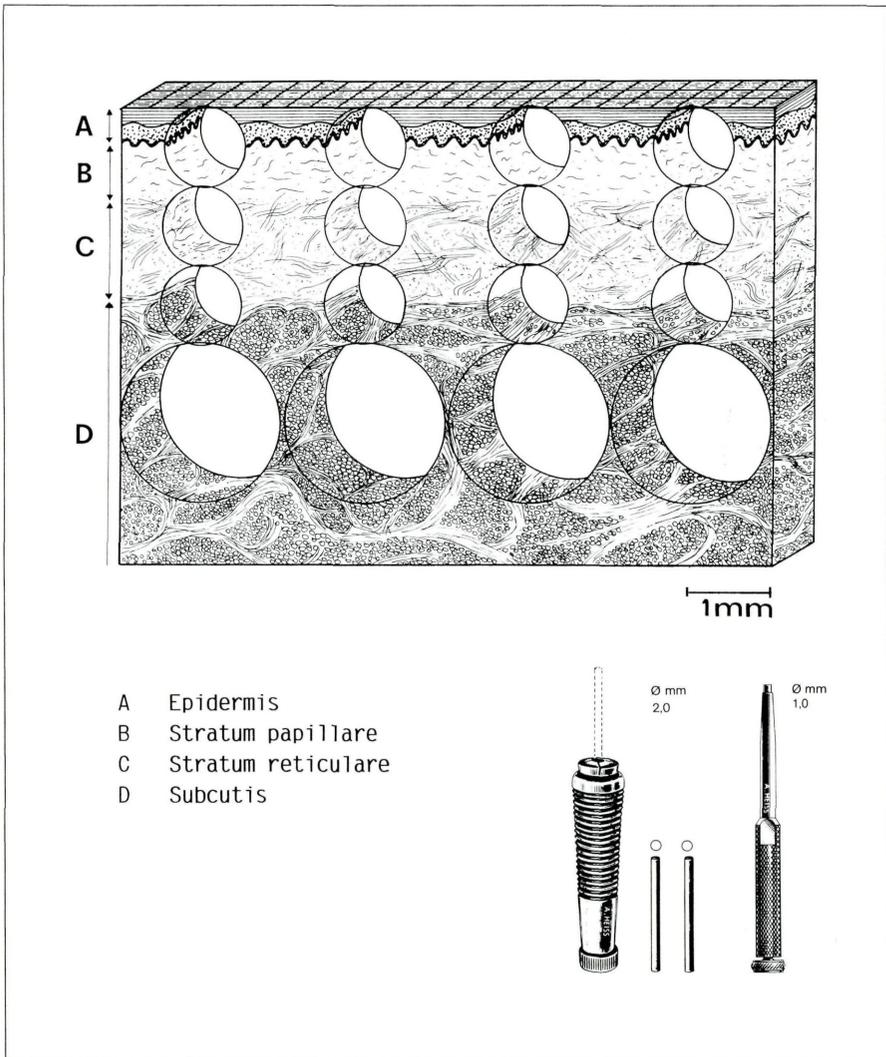


Abb. 1:

Blockdiagramm der menschlichen Haut mit schematischer Darstellung der Probenentnahme und der Abbildung der Trephinen (unten rechts).

stanzt. Nach dem Wiegen wurde das menschliche Gewebe in einer Kollagenaselösung (0,5% Kollagenase, 0,2 mg/ml Refobacin und 2,5 µg/ml Amphotericin B) verdaut, die Mikrofilarien dadurch freigelegt und mikroskopisch bei 60-facher Vergrößerung ausgezählt (17).

Für einen Vergleich der Mikrofilariendichten standen zusätzlich Werte zur Verfügung, die vor der Behandlung durch "skin snips" aus der Nähe der Exstirpationsstelle gewonnen waren.

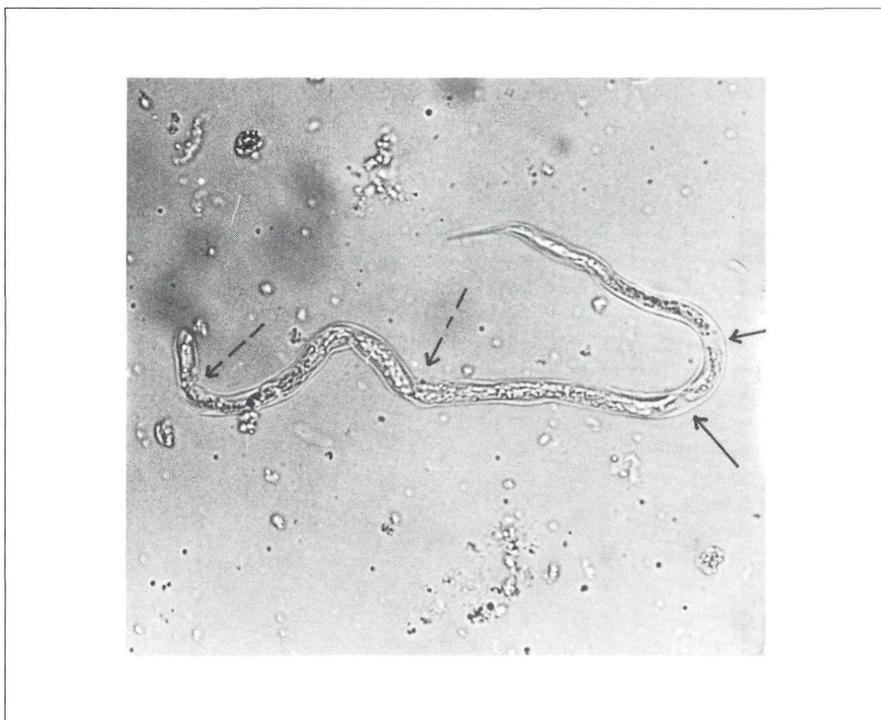


Abb. 2:
„Degenerierte“ Mikrofilarie mit somatischen Lücken (durchgezogene Pfeile) und stark veränderter Kutikula (gestrichelte Pfeile).

Auswertung

Als „degeneriert“ wurden Mikrofilarien bezeichnet, deren Kernsäule mindestens einmal unterbrochen war (12, 15), die grobe Unregelmäßigkeiten und partielle Lysen ihrer Kutikula zeigten oder beide Merkmale gleichzeitig aufwiesen (3, 8 [Abb. 2]). Aus den Mikrofilariendichten in den verschiedenen Hauttiefen wurde eine mittlere Aufenthaltstiefe der Mikrofilarien für jede der vier Beobachtungsgruppen (0 Tage = Placebo; 2, 4 und 28 Tage nach Ivermectinbehandlung) berechnet und Unterschiede in der mittleren Aufenthaltstiefe der Mikrofilarien bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p = 0,05$) mit dem R-Test auf Signifikanz geprüft (7).

Ergebnisse

Insgesamt wurden 528 aus 33 Wundrandbiopsien gestanzte Hautzylinder enzymatisch verdaut und dabei die Mikrofilarien freigelegt, beurteilt und ausgezählt.

Veränderungen der Mikrofilariendichte in der Haut

Zwei Tage nach Ivermectingabe wurden nur noch 21,8% der vor Therapiebeginn ermittelten Mikrofilarienzahlen gefunden. Sie verringerten sich weiter auf 14,9% und 6,1% vier bzw. 28 Tage nach Ivermectin-Behandlung (Abb. 3).

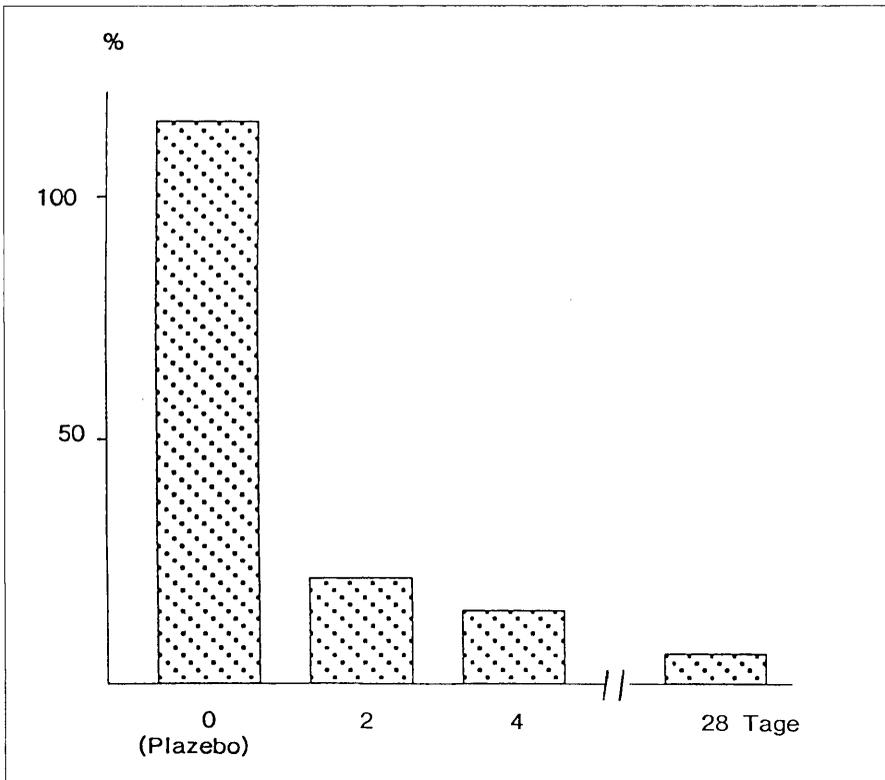


Abb. 3:

Relative Mikrofilariendichte in Biopsien bis 1 mm Tiefe nach Behandlung mit Ivermectin oder Placebo im Vergleich zur Situation vor der Medikation.

Degenerativ veränderte Mikrofilarien

Der Anteil degenerativ veränderter Mikrofilarien war mit 1,2 % in der Placebogruppe am geringsten (Abb. 4). Zwei Tage nach Ivermectinmedikation nahm ihre Zahl zu, ihr Anteil lag jetzt bei 30,7%, bezogen auf die noch vorhandenen Mikrofilarien, nach 4 Tagen bei 33% und fiel 28 Tage nach Ivermectingabe wieder auf 5,9% ab.

Mittlere Tiefe der Mikrofilarien in der Haut

Bei den placebobehandelten Patienten hielten sich 80% der Mikrofilarien in der obersten Hautschicht von 1 mm auf, bei einer mittleren Tiefe von 0,70 mm. Zwei Tage nach Ivermectingabe lagen die verbliebenen Mikrofilarien im Durchschnitt geringfügig tiefer (0,78 mm). Nach 4 und 28 Tagen fanden wir eine mittlere Tiefe von 0,99 mm bzw. 2,48 mm (Abb. 5).

Diskussion

Die von uns beschriebene höhenzonierte Untersuchung von Hautbiopsien erlaubt ohne größeren Aufwand eine qualitative und quantitative Bestimmung der Mikrofilarien in verschiedenen Hauttiefen und ermöglichte es uns, mehr über die Integrität und den Verbleib der Mikrofilarien von *O. volvulus* nach Ivermectinbehandlung zu erfahren.

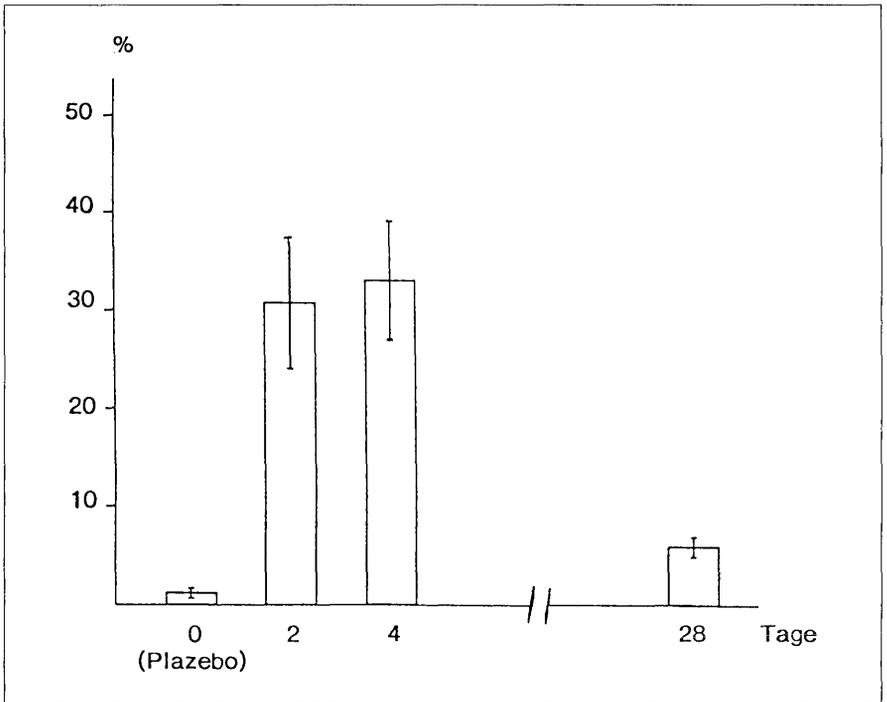


Abb. 4:
Anteil degenerativ veränderter Mikrofilarien in Biopsien bis 5 mm Tiefe verschiedene Tage nach Behandlung mit Ivermectin (bezogen auf die noch vorhandenen Mikrofilarien),

Bereits zwei Tage nach Ivermectin-Therapie waren nur 22% der ursprünglich vorhandenen Mikrofilarien in der Haut tatsächlich noch nachzuweisen. Hiervon war etwa ein Drittel degenerativ verändert, jedoch fanden wir überraschenderweise keine Bruchstücke von Mikrofilarien. Für eine Wanderung der Mikrofilarien in die Epidermis mit nachfolgender Degeneration in intraepidermalen Abszessen, wie dies für die Behandlung mit Diethylcarbamazin beschrieben ist (8, 10, 19), gab es keine Hinweise. Offenbar werden die geschädigten Mikrofilarien nicht an Ort und Stelle abgebaut.

Durch die schnellere Reduktion der Mikrofilarien in der obersten Hautschicht (1 mm) verschob sich ihre mittlere Tiefe in der Haut signifikant nach unten, und mehr als die Hälfte aller ausgezählten Mikrofilarien befanden sich 28 Tage nach Therapie in Proben tiefer als 1 mm. Hier können sie mit dem routinemäßigen skin snip nicht mehr erfaßt werden.

Wie können wir uns nun den Wirkungsmechanismus des Ivermectin vorstellen? Da histopathologische Studien das Fehlen entzündlicher Infiltrate um den vitalen Parasiten zeigen (5, 16, 22), liegt die Vermutung nahe, daß die aktive Bewegung der Mikrofilarien im Gewebe eine Anlagerung von immunkompetenten Zellen verhindert. Denn nur degenerierte Mikrofilarien sind deutlich von vielen Histozyten und eosinophilen Granulozyten umgeben (2, 6). Ivermectin blockiert GABA-vermittelte Impulse und ruft möglicherweise eine Lähmung der Mikrofilarien hervor, wodurch sie jetzt besser angegriffen werden könnten (4, 20, 21). So bewegten sich zwei Tage nach Ivermectin-

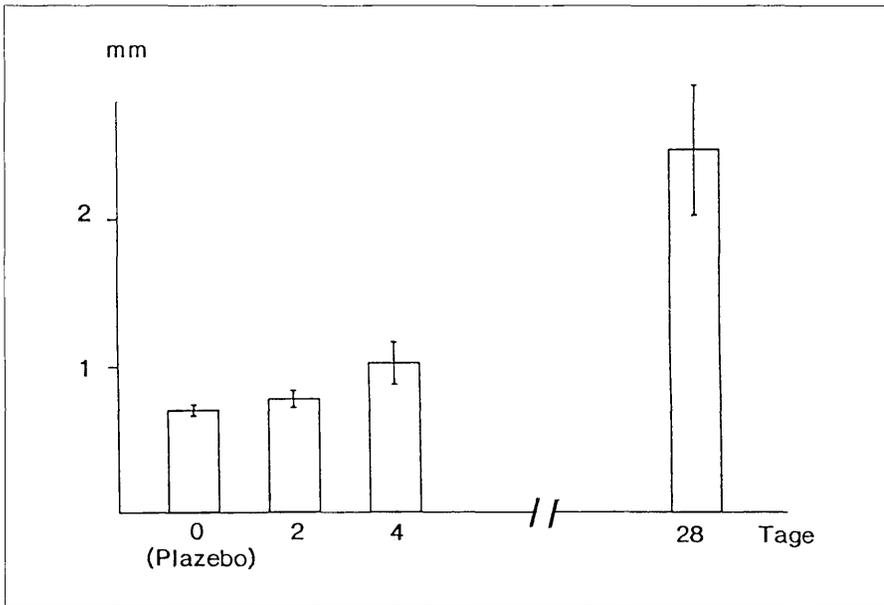


Abb. 5:

Mittlere Aufenthaltstiefe der Mikrofilarien in der Haut verschiedene Tage nach der Behandlung mit Ivermectin oder Plazebo.

behandlung aus "skin snips" isolierte Mikrofilarien tatsächlich deutlich langsamer als üblich (18) und zeigten auch ein verändertes Bewegungsmuster (14). Gleichzeitig verließen dosisabhängig weniger Mikrofilarien die Biopsien, was ebenfalls auf eine Beeinträchtigung der Bewegung schließen ließe (14).

Was geschieht nun mit den in ihrer Beweglichkeit beeinträchtigten Mikrofilarien? Immobile Mikrofilarien können leichter von Zellen des Immunsystems attackiert werden, degenerieren, wie von uns auch tatsächlich beobachtet, und werden über die Lymphdrainage des Koriums passiv aus der Haut geschwemmt, wo sie dann nicht mehr nachweisbar sind. Auch das Fehlen von Mikrofilarienbruchstücken in den untersuchten Wundrandbiopsien spricht gegen einen Abbau vor Ort in der Haut. Dieser könnte in entzündlich veränderten, regionalen Lymphknoten stattfinden. Da hierbei keine körperfremden Antigene frei werden, ließe sich somit auch das Ausbleiben der Mazzotti-Reaktion nach Ivermectintherapie einfach erklären (9, 11).

Zusammenfassung

Aus Hautbiopsien von Onchozerkosepatienten, die mit Ivermectin oder Plazebo behandelt worden waren, wurden in verschiedenen Zeitabständen Gewebeproben bis zu einer Tiefe von 5 mm höhenzoniert mit Hornhauttrephinen entnommen, mit Kollagenase verdaut und dadurch die Mikrofilarien freigelegt. Mikrofilarien mit erkennbarer Karyolysis oder veränderter Kutikula wurden als degeneriert bewertet. Nach Behandlung mit Ivermectin verringerte sich die Mikrofilariendichte in den obersten Hautproben auf 6,1% des Ausgangswertes. Der Anteil degenerativ veränderter Mikro-

filarien stieg von 1,2% auf 33% (vier Tage nach Ivermectinbehandlung). Aus den oberen Hautschichten eliminierte Mikrofilarien waren bis zu einer Tiefe von 5 mm selbst als Fragmente nicht mehr nachweisbar. Vermutlich werden in ihrer Mobilität beeinträchtigte Mikrofilarien durch Immunzellen geschädigt und passiv durch die Lymphdrainage abtransportiert.

Schlüsselwörter

Onchocercose, Ivermectin, Kollagenasetechnik, mikrofilarizide Wirkung, Verteilung der Mikrofilarien.

Summary

Distribution pattern of microfilariae (*Onchocerca volvulus*) in different skin depths after treatment with Ivermectin.

From patients with onchocerciasis treated with single oral doses of 100 - 200 µg Ivermectin/kg body weight or with placebo, skin biopsies were collected from the wound of nodulectomies 2, 4 and 28 days after treatment and fixed in ethanol. From these samples 528 biopsies deriving from four different depths down to 5 mm were punched out with corneoscleral trephines and digested with collagenase to assess the microfilarial densities. Microfilariae with loss of nuclei or an altered cuticle were classified as "degenerated".

Degenerated microfilariae increased rapidly from 1.2% in the placebo group to 33% (of the remaining microfilariae) four days after treatment, but no fragments of microfilariae could be found. In the depth of 0 - 1 mm the microfilariae density decreased to 6.1% compared to that of pretreatment level. However, microfilariae having disappeared from the uppermost layer could not be detected in the deeper layers. Ivermectin impairs obviously the motility of the microfilariae. Thus they might be damaged by adhering cells and subsequently eliminated via the lymphatic drainage.

Key words

Onchocerciasis, Ivermectin, collagenase technique, microfilaricidal efficacy, distribution of microfilariae.

Danksagung

Unsere Therapiestudie in Togo wurde in Zusammenarbeit mit dem togoischen Gesundheitsministerium durchgeführt und von MERCK, SHARP & DOHME, der Kommission der Europäischen Gemeinschaft, der WHO (OCT) und der GTZ unterstützt. Wir danken vor allem Frau Dr. G. Helling, Dr. M. A. Aziz, den Mitarbeitern des Institut National d'Hygiène (Direktor: Dr. D. Awissi), Lomé und des Tropenmedizinischen Instituts Tübingen.

Literatur

1. AWADZI, K., DADZIE, K. Y., SCHULZ-KEY, H., GILLES, H. M., FULLFORD, A. J., AZIZ, M. A. (1986):
The chemotherapy of onchocerciasis XI. A double-blind comparative study of ivermectin, diethylcarbamazine and placebo in human onchocerciasis in Northern Ghana.
Ann. Trop. Med. Parasit. 80 (4), 433 - 442.
2. BRYCESON, A. D. M. (1976):
What happens when microfilariae die?
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 70, 397 - 399.

3. BURCHARD, G. D., ALBIEZ, E. J., BIERTHER, M. (1979):
Electron microscopical studies on onchocerciasis II. Skin and microfilariae after treatment with metrifonate.
Tropenmed. Parasit. 30, 97 - 102.
4. CAMPBELL, W. C. (1985):
Ivermectin: An update.
Parasitology Today 1, 10 - 16.
5. CONNOR, D. H., WILLIAMS, P. H., HELWIG, L. B., WINSLOW, D. J. (1969):
Dermal changes in onchocerciasis.
Arch. Path. 87, 193 - 200.
6. CONNOR, D. H., MORRISON, N. E., KERDEL-VEGAS, F., BERKOFF, H. A., JOHNSON, F., TUNICLIFFE, R., FAILING, F. C., HALE, L. N., LINDQUIST, K. (1970):
Onchocercal dermatitis, lymphadenitis and elephantiastis in the Ubangi Territory.
Human Pathology 1, 553 - 579.
7. DUNCAN, P. B. (1955):
Multiple range and multiple F-tests.
Biometrics 11, 1 - 42.
8. GIBSON, D. W., CONNOR, D. H., BROWN, H. L., FUGLSANG, H., ANDERSON, J., DUKE, B. O. L., BUCK, A. A. (1976):
Onchocercal dermatitis: Ultrastructural studies of microfilariae and host tissues before and after treatment with diethylcarbamazine (Hetrazan).
Am. J. Trop. Med. Hyg. 25, 74 - 87.
9. GREENE, B. M., TAYLOR, H. R., CUPP, E. W., MURPHY, R. P., WHITE, A. T., AZIZ, M. A., SCHULZ-KEY, H., D'ANNA, S. A., NEWLAND, H. S., GOLDSCHMIDT, L. P., AUER, C., HANSON, A. P., FREEMAN, S. V., REBER, E. W., WILLIAMS, P. N. (1985):
Comparison of ivermectin and diethylcarbamazine in the treatment of onchocerciasis.
New Engl. J. Med. 313, 133 - 138.
10. HAWKING, F. (1952):
A histological study of onchocerciasis treatment with Hetrazan.
Brit. Med. J., 992 - 994.
11. HELLING, G., ADJAMGBA, A., MÖSSINGER, J., KLÄGER, S., SCHULZ-KEY, H. (1987):
Eine Phase-III-Therapiestudie mit Ivermectin an Onchocerkosepatienten in Zentral-Togo: Klinische und parasitologische Beobachtungen.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 9, 187 - 194.
12. LANGHAM, M. E., KRAEMER, T. R. (1980):
The "in vitro" effect of diethylcarbamazine on the motility and survival of *Onchocerca volvulus* microfilariae.
Tropenmed. Parasit. 32, 59 - 66.
13. LARIVIERE, M., VINGTAIN, P., AZIZ, M. A., BEAUVAIS, B., WEINMANN, D., DEROUIN, F., GINOUX, J., SCHULZ-KEY, H., GAXOTTE, P., BASSET, D., SARFATI, C. (1985):
Double-blind study of ivermectin and diethylcarbamazine in African onchocerciasis patients with ocular involvement.
The Lancet, July, 174 - 177.
14. MÖSSINGER, J., SCHULZ-KEY, H., HELLING, G., ADJAMGBA, A., KLÄGER, S. (1987):
Emergence of *Onchocerca volvulus* microfilariae from skin biopsies of patients treated with ivermectin.
Trop. Med. Parasit. 38, 69.
15. RODGER, F. C. (1962):
A review of recent advances in scientific knowledge of the symptomatology, pathology and pathogenesis of onchocercal infections.
Bull. Wld. Hlth. Org. 27, 429 - 448.
16. ROUGEMONT, A. G., DISCAMPS, G., BISSON, M. E., DE GRANDPRE, E., COLOMBANI, H. (1974):
Histopathologie de la réaction cutanée et comportement des microfilaires au cours du traitement de l'onchocercose par la diethylcarbamazine et par la suramine.
Medicine Tropical 34, 508 - 522.

17. SCHULZ-KEY, H., KARAM, M. (1984):
Quantitative assessment of microfilariae and adults of *Onchocerca volvulus* in the ethanol-fixed biopsies and nodules.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 78, 157 - 159.
18. SOBOSLAY, P. T., NEWLAND, H. S., WHITE, A. T., ERTTMANN, K. D., ALBIEZ, E. J., TAYLOR, H. R., WILLIAMS, P. N., GREENE, B. M. (1987):
Ivermectin effect on microfilariae of *O. volvulus* after a single oral dose in humans.
Trop. Med. Parasit., 38, 8 - 10.
19. STINGL, P., ROSS, M., GIBSON, D. W., RIBAS, J., CONNOR, D. H. (1984):
A diagnostic patch test for onchocerciasis using topical diethylcarbamazine.
Trans Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 78, 254 - 258.
20. TERADA, M., ISHII, A. L., KINOTT, Sano, M. (1984):
Angiostrongylus cantonensis: paralysis due to avermectin B_{1a} and ivermectin.
Exp. Parasit. 57, 149 - 157.
21. WANG, C. C., PONG, S. S. (1982):
Actions of avermectin B_{1a} on GABA nerves. In: *Membranes and genetic diseases.*
Prog. Clin. Biol. Res. 97, 373 - 395.
22. ZHAVORONKOV, A. A., BYKHOVETS, G. N. (1977):
Histopathological characteristics of the inguinal lymph nodes and skin in onchocerciasis.
Arkh. Patol. (USSR) 39, 66 - 71.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. H. Schulz-Key
Tropenmedizinisches Institut der Universität Tübingen
Wilhelmstrasse 31
D-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: 1988

Band/Volume: [10](#)

Autor(en)/Author(s): Jürgens S., Schulz-Key Hartwig

Artikel/Article: [Höhenzonierte Mikrofilarienverteilung \(Onchocerca volvulus\) in der Haut von Onchozerkosepatienten nach Behandlung mit Ivermectin. 69-77](#)