

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 11 (1989) 65 - 70

Landesinstitut für Tropenmedizin Berlin (Vorstand: Prof. Dr. U. Bienzle) (1)

Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien

(Vorstand: Prof. Dr. G. Wiedermann) (2)

Klinik für Chemotherapie der Universität Wien (Vorstand: Prof. Dr. K. Moser) (3)

Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen bei *Malaria tropica*

**P. G. Kremsner¹, G. M. Zotter¹, H. Feldmeier¹, R. Jansen-Rosseck¹, L. Näkel¹,
H. Kollaritsch², G. Wiedermann², W. Graninger³**

Einleitung

Obwohl in den letzten Jahren intensiv auf dem Gebiet der Immunologie des Wirtes bei Plasmodieninfektionen geforscht wurde, sind bis heute die exakten Mechanismen, die Einwohner endemischer Gebiete vor schweren Malaria-Erkrankungen schützen, letztlich unklar (8). Bis vor einigen Jahren noch konzentrierten sich Untersuchungen zur Immunität bei Malaria auf die humorale Komponente; Antikörper gegen Sporoziten- und Merozoiten-Antigene. Seit kurzem bekam das Zusammenspiel humoraler und zellulärer Immunität immer mehr Interesse. T-Lymphozyten und aktivierte Monozyten/Makrophagen sind nicht zuletzt als Produzenten von Zytokinen, wie Interferon gamma und Tumor-Nekrose-Faktor interessant geworden, wobei diese Zytokine wichtige Immunmodulatoren der Malaria im Tiermodell und beim Menschen darstellen (1, 3, 5).

Wie beschrieben, führt die akute Malaria beim Menschen zu einer Unterdrückung der zellulären Immunität (11), zur reduzierten Aktivität von Natural-Killer-(NK)-Zellen und zur Verminderung von CD4 + Lymphozyten (10). In der vorliegenden Arbeit berichten wir über die zahlenmäßige Veränderung peripherer mononukleärer Blutzellen (PMNZ) bei Patienten mit unkomplizierter *Malaria tropica* aus dem Regenwaldgebiet Amazoniens im Vergleich zu brasilianischen Kontrollpersonen.

Material und Methoden

Ort der Studie

Die Studie wurde in der Ambulanz des Gesundheitsministeriums in Rio Branco, Acre, Brasilien, von August bis Oktober 1987 durchgeführt.

Patienten und Kontrollpersonen

Die für die Patienten geltenden Aufnahmekriterien waren:

1. älter als 15 Jahre
2. Monoinfektion mit *Plasmodium falciparum*
3. keine Einnahme von Antimalariamittel in den vorangegangenen sieben Tagen
4. keine klinischen Komplikationen, wie etwa renale oder zerebrale Verlaufsform
5. keine Schwangerschaft.

Von den Patienten waren 34 Männer und 9 Frauen im Alter von 16 bis 50 Jahren (Median: 26 Jahre). Fünfzehn gesunde in Alter und Geschlecht vergleichbare Personen aus Rio Branco stellten sich als Kontrollpersonen zur Verfügung. Alle Studienteilnehmer blieben während des Beobachtungszeitraums in dem Malaria-freien Rio Branco. Das mündliche Einverständnis für die geplanten Untersuchungen wurde von allen Probanden vor Beginn der Studie erhalten.

Klinische Untersuchungen

Die physikalische Untersuchung wurde bei der Aufnahme zwischen 8 und 11 Uhr durchgeführt. Die Patienten wurden anschließend täglich morgens während der ersten Woche untersucht. Axilläre Temperatur wurde gemessen. Die letzte Untersuchung erfolgte 28 Tage nach Therapiebeginn.

Chemotherapie

Aufgrund der hohen Frequenz multiresistenter Stämme von *Plasmodium falciparum* in Acre (6) wurde das hochwirksame Linkomyacin Clindamycin als Chemotherapeutikum gewählt. Alle Probanden erhielten Clindamycin-Tabletten in einer Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht zweimal täglich fünf Tage lang.

Laboruntersuchungen

Heparinisierte Blutproben wurden vor der Behandlung und 28 Tage später entnommen. Hämatokrit und Differentialblutbild wurden nach Routinevorschriften durchgeführt. Dicke Tropfen wurden innerhalb der ersten Woche nach Therapiebeginn täglich, später wöchentlich bis vier Wochen nach Therapie gemacht und nach einer anderwärtig beschriebenen Methode wurden die asexuellen Plasmodien ausgezählt (7).

Die mononukleären Zellen wurden aus dem heparinisierten Blut über Dichte-Gradientenzentrifugation entnommen (Leuco PREP, Becton Dickinson CA, USA). Monoklonale Antikörper von Mäusen gegen CD3, CD4, CD8, CD20, CD57 (Behring, Wien, Österreich) und gegen CD25 (Becton Dickinson CA, USA) wurden zur Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen verwendet. Fluorescein-markiertes Ziegen anti-Maus IgG wurde als zweiter Antikörper eingesetzt (Behring, Wien, Österreich). Je 100 Lymphozyten wurden im Fluoreszenz-Mikroskop ausgezählt (Leitz, Wien, Österreich). Das genaue Vorgehen wurde kürzlich beschrieben (4).

Statistische Methoden

Unterschiede in den Parametern zwischen Patienten und Kontrollen wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet. Unterschiede in den Parametern vor und nach Therapie wurden mit dem Wilcoxon-Test kalkuliert. Der Median und seine 95% Vertrauensgrenzen (95% VG) dienten als beschreibende Werte.

Ergebnisse

Klinische und parasitologische Parameter

Alle Patienten hatten einen milden Krankheitsverlauf ohne *Plasmodium falciparum* assoziierte Komplikationen und konnten daher ambulant betreut werden. Klinische und parasitologische Daten der Patienten bei der Aufnahme sind in Tabelle 1 aufgelistet. Axilläre Temperaturen von 36,0° C - 39,1° C wurden gemessen. Der Median lag bei 37,0° C. Kopfschmerzen, Übelkeit und Rückenschmerzen waren die häufigsten Symptome. Hämatokrit-Werte von Patienten (Median: 38%) waren wie erwartet signifikant geringer als bei den Kontrollpersonen (Median: 45%) ($p < 0,05$). Nahezu 90% der Patienten, aber nur eine Kontrollperson, hatten innerhalb des vorangegangenen Jahres wenigstens eine Plasmodieninfektion gehabt.

TABELLE 1
Klinische Zeichen, Symptome und Parasitämie der Patienten bei der Aufnahme

Klinische Parameter	n	%
Splenomegalie	28	64
Kopfschmerzen	22	50
Nausea	21	48
Rückenschmerzen	14	32
Hepatomegalie	11	25
Fieber ($\geq 37,5^\circ \text{C}$)	8	18
Schwindel	6	14
Erbrechen	6	14
Durchfall	2	5
Schüttelfrost	1	2
Parasiten/ μl Blut ^a	2.220	(1.530 - 4.572)

^a Median (95% VG)

TABELLE 2
Subpopulationen peripherer mononukleärer Blutzellen der Kontrollpersonen und der Patienten vor (Tag 0) und nach Chemotherapie (Tag 28)
 Median und 95% VG sind in Zellzahlen/ μl Blut angegeben.

	Patienten (Tag 0)	Patienten (Tag 28)	Kontrollen (Tag 0)
Monozyten	110 (80 - 130)	121 (92 - 188)	114 (70 - 144)
Lymphozyten	1650 (1400 - 2200)	2300 (1900 - 2900)	2000 (1500 - 2500)
CD3+ Zellen	1159 (942 - 1404)	1620 (1368 - 2058)	1327 (1073 - 1674)
CD4+ Zellen	613 (497 - 781)	1033 (874 - 1323)	891 (710 - 1167)
CD8+ Zellen	469 (422 - 560)	532 (389 - 619)	454 (302 - 538)
CD20+ Zellen	180 (157 - 208)	206 (189 - 241)	208 (145 - 236)
CD25+ Zellen	93 (56 - 117)	67 (50 - 108)	63 (38 - 73)
CD57+ Zellen	298 (257 - 345)	282 (190 - 378)	292 (175 - 340)

Während der Clindamycin-Chemotherapie verschwanden die Symptome rasch. Der Großteil der Patienten war am dritten oder vierten Tag der Therapie beschwerdefrei, obwohl keinerlei adjuvante symptomatische Medikation verabreicht wurde. Vor der Therapie gab es eine große Spannweite der Parasitämie (12 - 79.560 Plasmodien/ μl Blut; Tabelle 1). Nach fünf Tagen Clindamycin-Behandlung hatten nur noch 16 von 44 Patienten nachweisbare, geringe Parasitendichten im peripheren Blut. Zwei Tage nach abgeschlossener Chemotherapie waren bereits alle untersuchten Dicken Tropfen negativ. Weder klinische noch parasitologische Rekrudescenzen traten innerhalb der vierwöchigen Beobachtungszeit auf.

Mononukleäre Blutzellen

Mediane und 95% VG der PMNZ werden in Tabelle 2 gezeigt. Die Zahlen der PMNZ der Patienten sind vor und nach Chemotherapie dargestellt. Da sich bei den Kontrollpersonen vor und nach Clindamycingabe keine signifikanten Veränderungen ergaben, sind hier lediglich die Ergebnisse vor Clindamycineinnahme angeführt. Obwohl sich bei den Patienten in der akuten Krankheitsphase eine leichte Lymphozytopenie zeigte, waren die Lymphozyten- und Monozyten-Zahlen im Vergleich zu den Kontrollen nicht

signifikant unterschiedlich. Auch CD3+ Zellen waren etwas, aber nicht signifikant, reduziert. Hingegen waren CD4+ 'helper/inducer' T-Lymphozyten, verglichen zu den Kontrollen signifikant vermindert ($p < 0,01$). Vier Wochen später normalisierte sich die Zahl, auch dieser Unterschied vor und nach Therapie war hoch signifikant ($p < 0,01$). Die CD8+ 'suppressor/cytotoxic' T-Lymphozyten der Patienten waren relativ erhöht. Die absoluten Zahlen unterschieden sich allerdings nicht. Damit zeigte sich aber auch ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen vor Therapie in der CD4/CD8 Ratio: Der Median bei den Patienten lag bei 1,3 gegenüber 2,0 bei den Kontrollen ($p < 0,05$).

Der deutliche relative Anstieg der CD25+ Zellen, Interleukin 2-Rezeptor tragender Zellen bei Patienten in der akuten Phase der Malaria war in absoluten Zahlen statistisch nicht signifikant. Die gleiche relative Erhöhung zeigen NK-Zellen (CD57+) und B-Lymphozyten (CD20+), allerdings waren auch hier die absoluten Zell-Zahlen bei Patienten vor und nach Therapie und bei Kontrollpersonen sehr ähnlich.

Diskussion

Eine Lymphozytopenie ist ein häufig beobachteter Befund bei Patienten mit *Plasmodium falciparum*-Infektionen. Unsere Untersuchungen machen deutlich, daß die Verminderung der Lymphozyten aufgrund reduzierter Zahlen von zirkulierenden T-Zellen auftritt. Innerhalb der T-Lymphozyten sind es die CD4+ 'helper/inducer' T-Zellen, die drastisch vermindert sind, und somit ein CD4+/CD8+ Verhältnis von 1,3 entsteht. Die hier beschriebene selektive CD4+ Reduktion unterstreicht die Befunde anderer Autoren bei Kindern und *Plasmodium falciparum*- und *Plasmodium vivax*-infizierten Erwachsenen aus verschiedenen endemischen Gebieten (9, 10). In vitro führt die Stimulation von PMNZ von Patienten mit Schizonten Antigenen zu einer klonalen Expansion von CD4+ Zellen (2), welches allerdings im Gegensatz zu den in vivo Beobachtungen steht. Hypothetische Erklärungsversuche bilden die Befunde zytolytisch wirksamer Autoantikörper gegen CD4+ T-Zellen (9) oder die mögliche Sequestration dieser Zellen in der Endstrombahn von Leber und Milz, wo hohe Antigenmengen stimulierend wirken. Die Verminderung der CD4+ Zellen ist aber gut vereinbar mit der bekannten klinischen Immunsuppression während der akuten Phase der Malariainfektion (11).

Das Ergebnis der relativen Vermehrung der Interleukin 2-Rezeptor tragenden Zellen (CD25+) würde wieder zu den in vitro Resultaten einer stimulierten CD4 Lymphozyten-subpopulation passen. Jedoch konnten hierbei wie auch in der Verteilung der B-Zellen und NK-Zellen keine statistisch signifikanten Unterschiede gezeigt werden.

Wir fassen zusammen, daß eine Clindamycingabe beim Gesunden keine Veränderungen in der Verteilung der Subpopulationen der PMNZ herbeiführt, und daß die durch Malaria bedingten Störungen in der phänotypischen Zusammensetzung der mononukleären Zellen im peripheren Blut durch eine effiziente Chemotherapie der *Malaria tropica* beseitigt werden.

Zusammenfassung

Bei brasilianischen Patienten mit einem unkomplizierten klinischen Verlauf einer *Plasmodium falciparum*-Infektion und bei einer brasilianischen Kontrollgruppe wurden neben hämatologischen Basisdaten, die CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD25+ und CD57+ Lymphozyten-subpopulationen vor und nach Chemotherapie mit Clindamycin bestimmt. Die meisten Patienten waren leicht lymphozytopenisch, der Unterschied zur Kontrollgruppe war jedoch nicht signifikant. Die Lymphozytopenie war einer Minderung der Zahl der T-Zellen (CD3+) zuzuschreiben, in diesem Kompartiment waren es CD4+ 'helper/inducer' T-Zellen, die hoch signifikant erniedrigt waren ($p < 0,01$). Das führte zu einer CD4+/CD8+ Ratio von 1,3, verglichen mit 2,0 bei den Kontrollen. 'Natural

Killer'-Zellen (CD57+), B-Lymphozyten (CD20+) und Interleukin 2 tragende Zellen (CD25+) waren zwar relativ erhöht, unterschieden sich aber in absoluten Zahlen nicht signifikant von den Kontrollen.

Schließlich normalisierten sich aber alle numerischen phänotypischen Veränderungen der Lymphozyten im peripheren Blut nach erfolgreicher Chemotherapie der *Malaria tropica*.

Schlüsselwörter

Plasmodium falciparum, Lymphozytensubpopulationen.

Danksagung

Die Studie wurde zum Teil vom Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Österreich, unterstützt (P6233M). Wir danken der Firma Behring in Wien für die Gabe der monoklonalen Antikörper; der Firma Becton Dickinson für Leuco PREP; der Firma Leitz Austria für die Bereitstellung eines Laborlux-K-Mikroskopes mit Fluoreszenzeinrichtung.

Summary

Alterations of lymphocyte subpopulations in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria

CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD25+ and CD57+ lymphocyte subpopulations were determined in Brazilian patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria before and after clindamycin treatment and in a control group. Most patients presented lymphopenia with a decrease in T-cells (CD3+), however, the decrease was not significant compared to controls. The reduction of T-cells was due to a highly significant decrease in CD4+ helper/inducer T-lymphocytes ($p < 0.01$), leading to a CD4+/CD8+ ratio of 1.3 versus 2.0 in controls. Although numbers of natural killer cells (CD57+), B-lymphocytes (CD20+) and interleukin 2 bearing cells (CD25+) were relatively increased, absolute numbers did not differ from those of controls.

It is concluded that falciparum malaria induces numerical alterations in lymphocyte subsets, which are reversible after efficient chemotherapy.

Literatur

1. BIENZLE, U., FRITSCH, K. G., HOTH, G., ROZDZINSKI, E., KÖHLER, K., KALINOWSKI, M., KREMSNER, P., ROSENKAIMER, F., FELDMEIER, H. (1988): Inhibition of *Plasmodium vinckei*-malaria in mice by recombinant murine interferon-gamma. *Acta Trop.* 45, 289 - 290.
2. CHIZZOLINI, C., PERRIN, L (1988): Antigen specific and MHC restricted *Plasmodium falciparum* induced T-lymphocyte clones. *J. Immunol.* 137, 1022 - 1028.
3. CLARK, I. A. (1987): Monokines and lymphokines in malarial pathology. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 81, 577 - 585.
4. GASTL, G. A., FELDMEIER, H., DOEHRING, E., KORTMANN, C., DAFFALLA, A. A., PETER, H. H. (1984): Numerical and functional alterations of lymphocytes in human schistosomiasis. *Scand. J. Immunol.* 19, 469 - 479.
5. GRAU, G. E., FAJARDO, L. F., PIQUET, P. F., ALLET, B., LAMBERT, P. H., VASSALLI, P. (1987): Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* 237, 1210 - 1212.

6. KREMSNER, P. G., ZOTTER, G. M., FELDMIEIER, H., GRANINGER, W., KOLLARITSCH, H., STEMBERGER, H., WIEDERMANN, G., ROCHA, R. M., WERNSDORFER, W. H. (1988):
In vitro Resistenzbestimmung von Plasmodium falciparum in Acre/Brasilien (Zwischenbericht).
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 10, 249 - 253.
7. KREMSNER, P. G., ZOTTER, G. M., FELDMIEIER, H., GRANINGER, W., ROCHA, R. M., WIEDERMANN, G. (1988):
A comparative trial of three regimens for treating uncomplicated falciparum malaria in Acre, Brazil.
J. Infect. Dis. 158, 1368 - 1371.
8. MCGREGOR, I. A. (1987):
Malarial immunity: current trends and prospects.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 81, 647 - 656.
9. MERINO, F., LAYRISSE, Z., GODOY, G., VOLCAN, G. (1986):
Immunoregulatory alterations in Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections.
Trop. Med. Parasitol. 37, 241- 244.
10. STACH, J. L., DUFRENOY, E., ROFFI, J., BACH, M. A. (1986):
T-cell subsets and natural killer activity in Plasmodium falciparum-infected children.
Clin. Immunol. Immunopathol. 38, 129 - 134.
11. TOSTA, C. E. (1987):
Immunodeficiencia asociada a malaria.
Rev. Soc. Brasil. Med. Trop. 20, 1 - 5.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. Peter G. Kremsner
Landesinstitut für Tropenmedizin Berlin
Königin-Elisabeth-Straße 32
D-1000 Berlin 19 · 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: 1989

Band/Volume: [11](#)

Autor(en)/Author(s): Kreamsner Peter Gottfried, Zotter G. M., Feldmeier H., Rosseck R. Jansen, Näkel L., Kollaritsch Herwig, Wiedermann Gerhard, Graninger W.

Artikel/Article: [Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen bei Malaria tropica. 65-70](#)