

## Roztocze z rodzaju *Demodex* – charakterystyka, chorobotwórczość, diagnostyka

### *Demodex* mites – characteristics, pathogenicity, diagnostics

Dominika Skonieczna<sup>1</sup>, Paulina Sławianowska<sup>1</sup>, Roland Wesołowski<sup>2</sup>, Karolina Szewczyk-Golec<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Studenckie Koło Naukowe Biologii Medycznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

<sup>2</sup>Katedra Biologii i Biochemii Medycznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

#### Streszczenie

Nużeniec – *Demodex* spp.– to roztocze, które kolonizując skórę człowieka może prowadzić do rozwoju demodekozy – choroby wywołanej u ludzi przez dwóch przedstawicieli tego rodzaju, tj. *D. folliculorum* i *D. brevis*. Stan chorobowy dotyczy głównie schorzeń oczu oraz skóry twarzy, natomiast coraz częściej kojarzony jest również jako czynnik patologiczny w przebiegu cukrzycy oraz choroby nowotworowej. Diagnostyka nużycy opiera się najczęściej na klasycznej technice mikroskopowej, a dostępność technik biologii molekularnej pozwala na poznanie różnorodności międzygatunkowej tych roztoczy. W leczeniu inwazji nużeńcem stosuje się przede wszystkim leczenie miejscowe z użyciem tlenku rtęci, maści na bazie metronidazolu oraz terapię skojarzoną z ivermektyną. Skuteczność potwierdzono również w przypadku zastosowania olejku z drzewa herbacianego. Diagnostyka w kierunku roztoczy z rodzaju *Demodex* zyskuje coraz większą popularność, a dzięki ciągłemu rozwojowi metod diagnostycznych możliwe jest coraz łatwiejsze rozpoznawanie ich jako czynnika patogennego w wielu schorzeniach.

#### Abstract

*Demodex* is a mite that colonise the human skin and thus can contribute to initiation of demodicosis – a disease caused in humans by two species (*D. folliculorum* and *D. brevis*). Demodicosis mostly involves eyes and facial skin, whereas it has become increasingly associated as an pathologic factor in diabetes mellitus and cancer. *Demodex* diagnostics is based on a simple classical microscopy. The availability of modern molecular biology techniques helps to get to know interspecies diversity of *Demodex*. Local treatment with mercury oxide, ointments containing metronidazole and combined therapy with ivermectin are used in the treatment of demodex invasion. The effectivity of tea tree oil ointment (TTOO) has been also confirmed. Diagnostics towards the demodex mite colonization is gaining in popularity. It is possible to diagnose it easily as a pathogenic factor in many diseases due to development of diagnostic methods.

**Słowa kluczowe:** biopsja skóry, cukrzyca, nowotwory, nużeniec, roztocza, trądzik różowaty

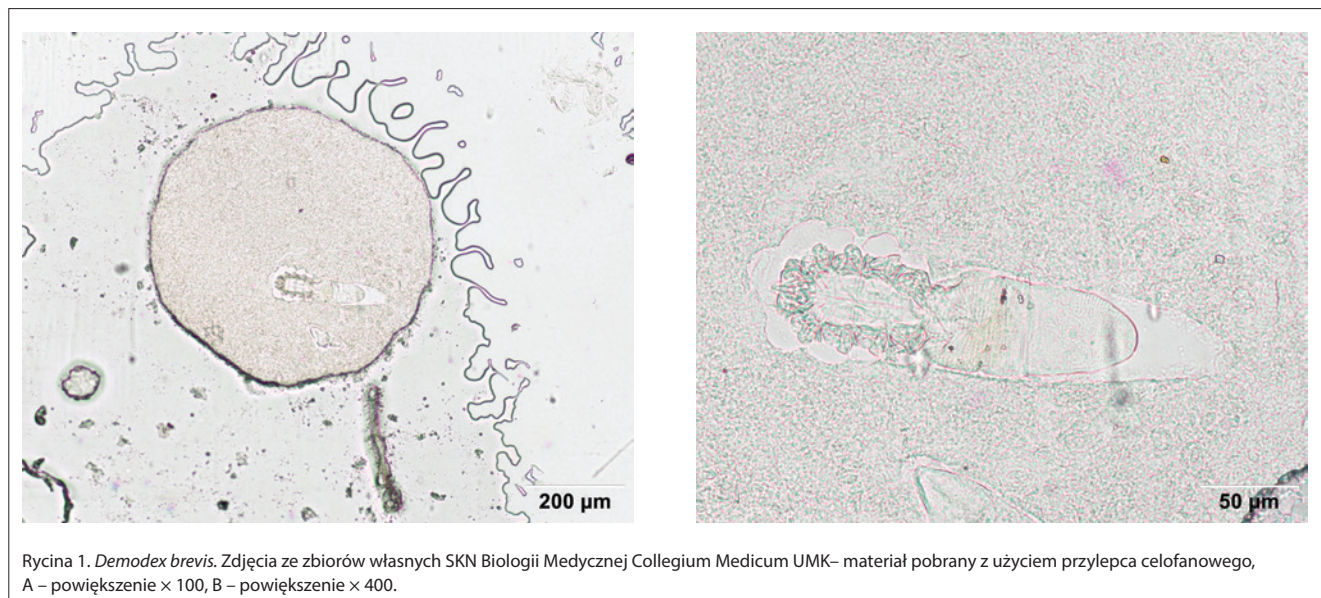
**Key words:** cancer, demodex, diabetes mellitus, mites, rosacea, skin biopsy

#### Wstęp

Nużeńce to kosmopolityczne roztocze, które mogą kolonizować skórę człowieka. Do przedstawicieli rodzaju *Demodex* należą *Demodex folliculorum* bytujący w mieszkach włosowych oraz prowadzący pasożytniczy tryb życia w gruczołach łojowych *Demodex brevis* (Ryc. 1). Kolonizacja skóry tymi roztoczami bierze udział w patogenezie wielu schorzeń, wśród których możemy wymienić m.in. chroniczne zapalenie powiek, stany zapalne oraz zespół suchego oka. Obecność nużeńców nie zawsze wywołuje objawy chorobowe, jednak nie można uważać tych roztoczy za całkowicie niepatogeniczne. Diagnostyka w kierunku kolonizacji osobnikami *Demodex* spp. jest prosta i możliwa z użyciem typowego wyposażenia laboratorium.

#### Charakterystyka *Demodex* spp.

*Demodex* spp. należą do klasy pajęczaków (*Arachnida*) rzędu roztoczy (*Acari*) [1]. Osobniki mają wydłużony kształt z wyodrębnioną częścią głową, zaopatrzoną w sztyletowate chelicery. Z przedniej części ciała odchodzą cztery pary krótkich, teleskopowych odnóży [2]. Poszczególne gatunki są słabo zróżnicowane pod względem morfologicznym, natomiast wykazują znaczną specyficzność wobec żywicieli [3]. Wyróżnić można ponad 100 gatunków nużeńców, wszystkie są obligatoryjnymi komensalami ssaków [4]. Z człowiekiem można powiązać dwa gatunki z rodzaju *Demodex* – *Demodex folliculorum* (nużeniec ludzki) oraz *Demodex brevis* (nużeniec krótki). Często pojawiają się one w obszarach łojotokowych skóry twarzy (czoło, broda, okolice wokół oczu i ust).



Rycina 1. *Demodex brevis*. Zdjęcia ze zbiorów własnych SKN Biologii Medycznej Collegium Medicum UMK – materiał pobrany z użyciem przylepca celofanowego, A – powiększenie  $\times 100$ , B – powiększenie  $\times 400$ .

Możliwe jest również zaobserwowanie ich na owłosionej skórze głowy lub w obszarze genitaliów [1]. W przypadku zasiedlenia powiek, *D. folliculorum* znajduje się w mieszkach włosowych rzęs, natomiast *D. brevis* w gruczołach łojowych rzęs i gruczołach Meiboma, gdzie bytuje jako pojedynczy osobnik [2]. Roztocze te są białe lub żółte i mają wydłużony owalny kształt, który zwęża się ku tyłowi. Nużeńce żywią się sebum, limfą, osoczem krwi i komórkami nabłonkowymi [1].

Pasożyty te przenoszą się poprzez bezpośredni kontakt ze skórą osoby zarażonej, za pośrednictwem pościeli, ręczników, kosmetyków oraz prawdopodobnie z kurzem [3]. Dorosły osobnik może przetrwać trzy tygodnie w wilgotnym środowisku, natomiast ze względu na fakt, że roztocze te są bardzo podatne na wysychanie, nie są zdolne do przeżycia przez dłuższy czas poza ciałem żywiciela [4]. Suche środowisko może spowodować ich śmierć w ciągu 36 godzin [4]. We wszystkich fazach ich cyklu życiowego unikają światła słonecznego. Wyłaniają się z komórek łojowych w nocy i migrują po powierzchni skóry w celu znalezienia partnera, poruszając się z prędkością około 16 mm na godzinę [4].

Cykl życiowy roztoczy *Demodex* spp. trwa od 14 do 18 dni i składa się z pięciu etapów rozwoju, od jaja, przez larwę, protonimfę i nimfę do postaci dorosłej [4]. Kopulacja odbywa się w pobliżu wejścia do mieszka włosowego, następnie zapłodniona samica przemieszcza się do wnętrza gruczołów łojowych, by złożyć jaja [4]. Z jaj wylęgają się larwy, które ulegają przeobrażeniu kolejno w drugie stadium rozwojowe posiadające trzy pary odnóży, a następnie w nimfę, po czym osiągają stadium osobnika dorosłego. Osobnik dorosły *Demodex folliculorum* osiąga długość 300-400  $\mu\text{m}$ , natomiast *Demodex brevis* – 250-280  $\mu\text{m}$  [1]. Co ciekawe, wykazano, że około połowa roztoczy w ujściach mieszka włosowego jest martwa, dlatego mają one tendencję do blokowania otworów pęcherzykowych i zaniechania świeżych inwazji [5].

### Chorobotwórczość

#### Oczy

Nużeńce odgrywają znaczną rolę w patogenezie schorzeń oczu. Objawy zapalenia brzegów powiek (łac. *blepharitis*) to rosnący

problem, z którym coraz częściej zgłaszają się pacjenci do poradni okulistycznych. Należą do nich: przekrwienie oczu, tkliwość i ból, uczucie swędzenia, zaczerwienienia wzdłuż linii rzęs i nadwrażliwość na światło. *D. folliculorum* najczęściej umiejscawia się w mieszkach rzęs, natomiast *D. brevis* we wnękach gruczołów łojowych i gruczołów Meiboma, które produkują wydzielinę stanowiącą powierzchnię warstwę przedoczną filmu łzowego [6]. Wywołane przez *Demodex* spp. zapalenie przedniej krawędzi powiek jest spowodowane przez mechaniczne podrażnienie pęcherzyków rzęs, w połączeniu z podrażnieniem chemicznym przez produkty przemiany materii pasożyta [7]. Baima i Sticherling [8] zasugerowali, że zmiany chorobowe w nużycy powiek pojawiają się w wyniku kilku istotnych mechanizmów, takich jak blokowanie mieszków włosowych oraz kanałów gruczołów Meiboma, procesy hiperplazji nabłonka, przenoszenie bakterii, powstanie humoralnej odpowiedzi gospodarza pod wpływem stymulacji oraz rozwój procesu zapalnego wywołanego obecnością chityny *Demodex* spp. Zakażeniu towarzyszy rozszerzenie naczyń krwionośnych skóry, spowodowane przez zapalenie skóry powiek [7]. Ponadto cebulki rzęs zmieniają swoje usytuowanie, a tym samym kierunek wzrostu włosów, co powoduje ich utratę [7]. W zaburzeniu czynności gruczołów Meiboma zapaleniu tylnej krawędzi powieki może towarzyszyć zespół suchego oka [7]. Zapalenie brzegów powiek nie jest jedyną możliwą dolegliwością, która jest spowodowana przez obecność nużeńców. Roztocze z rodzaju *Demodex* biorą także udział w rozwoju zapalenia spojówek, które często może być także powikłaniem wyżej opisanej dolegliwości.

#### Skóra

Nużeńce zyskują coraz większą uwagę lekarzy dermatologów. Trądzik różowaty (łac. *rosacea*) to schorzenie objawiające się występowaniem na twarzy wykwitów w postaci zaczerwienień, grudek oraz krostek. Ma podłoże genetyczne, ale uwarunkowane jest również przez czynniki środowiskowe oraz predyspozycje immunologiczne. Chorzy na trądzik różowaty produkują sebum ze zmienionym profilem kwasów tłuszczowych, co sugeruje, że

charakter sebum, a nie jego ilość sprzyja rozwojowi roztoczy z rodzaju *Demodex* [4].

Wyniki badań przeprowadzonych przez Hamideh Moravvej [9] na grupie 75 pacjentów z trądzikiem różowatym wykazały obecność nużeńców u 29 osób (38.6%). Coraz powszechniejsze badania na temat znaczenia nużeńców w patogenezie trądziku różowatego dostarczają dowodów na to, że nie sama obecność roztoczy może mieć bezpośredni wpływ na rozwój choroby, ale towarzyszące temu przenoszenie mikroorganizmów. O'Reilly i wsp. [10] przeprowadzili badania na grupie 26 pacjentów chorujących na trądzik różowaty. Bakterie *Bacillus oleronius* wyizolowane z nużeńców od pacjentów z grudkowo-krostkowym trądzikiem różowatym były zdolne do produkcji białkowych antygenów [10]. U 80% pacjentów z grupy badanej stwierdzono w surowicy zwiększoną reaktywność białek o masie 62-83 kDa, które wykazują podobieństwo do silnie immunogennych chaperonów. Patogenezę ziarniniakowego trądziku różowatego w swojej pracy tłumaczy Forton [11]. Nużeńce powodują uszkodzenie bariery skórnej oraz złuszczenie skóry, co może być źródłem nadwrażliwości spotykanej u pacjentów z trądzikiem różowatym. Dolegliwości są spowodowane również obecnością nużeńców w skórze właściwej, do której przedostają się one w sposób bierny lub aktywny [11]. Liczne badania potwierdzają hipotezę, że nużeńce powodują u ludzi nadwrażliwość typu IV [11]. Wyniki biopsji skórnych opisane przez Fortona [11] potwierdziły ponadto występowanie dwóch antyproteaz przeciwko *D. folliculorum* i *D. brevis* jako prawdopodobnej reakcji obronnej organizmu na obecność pasożytów.

Zarażenie nużeńcem może mylnie sugerować występowanie innych stanów chorobowych. Smith [12] badał pacjentów z nieprawidłowościami skórnymi, podejrzewając u nich raka podstawonokomórkowego. Po pobraniu wycinka i badaniu histopatologicznym stwierdzono zarażenie omawianym pasożytem. Może to sugerować konieczność brania pod uwagę roztoczy *Demodex* spp. w diagnostyce różnicowej raka podstawonokomórkowego [12]. Interesującym zjawiskiem jest związek między obecnością *Demodex* spp., a stosowaniem chemioterapii. Olt [13] opisał przypadek 45-letniej pacjentki z rakiem piersi, przyjętej do kliniki onkologicznej w celu podania adjuwantowej chemioterapii składającej się z adriamycyny, cyklofosfamidu i 5-fluorouracylu. Pacjentka posiadała liczne zaczerwienienia na policzkach i czole, jednak w badaniach biochemicznych nie stwierdzono żadnych nieprawidłowości [13]. Przed podaniem chemioterapii przeprowadzono badanie na obecność nużeńców za pomocą standaryzowanej biopsji powierzchniowej skóry. Na lewym i prawym policzku zidentyfikowano 20 osobników na 1 cm<sup>2</sup>, natomiast na czole 15 osobników na 1 cm<sup>2</sup> [13]. Po podaniu chemioterapii pacjentka zgłosiła się do kliniki z nasilającymi się objawami w postaci zaczerwienienia skóry w obrębie twarzy. Ponowne badanie wykazało nasilenie występowania osobników nużeńca w ilości 50 na 1 cm<sup>2</sup> na skórze policzków oraz 30 na 1 cm<sup>2</sup> w obrębie czoła. Wzrost liczności roztoczy był prawdopodobnie związany z immunosupresją spowodowaną chemioterapią.

Obecność osobników *Demodex* spp. w obrębie skóry może powodować liczne, trudne do wyleczenia schorzenia, jednak dzięki rozszerzającej się w ich kierunku diagnostyce coraz szerzej pozna-

wana jest ich rola w patogenezie różnych chorób i dolegliwości skórnych.

### Cukrzyca

Publikacji dotyczących częstości występowania inwazji *Demodex* spp. u pacjentów chorujących na cukrzycę jest niewiele. W przeprowadzonych badaniach obserwuje się jednak zależność występowania zwiększonej inwazji nużeńcem ludzkim u osób z cukrzycą. Cukrzyca typu 2 jest częstym zaburzeniem metabolicznym, którego objawy kliniczne, takie jak świąd oraz inne skórne dolegliwości, mogą przyczynić się do nierozpoznania *D. folliculorum* jako przyczyny dolegliwości [14]. Clifford i Fulk [15] zbadali w kierunku *Demodex folliculorum* rzęsy 256 osób. Stwierdzili obecność nużeńca ludzkiego u 16% badanych, ponadto roztocze były bardziej liczne u osób starszych i cierpiących na cukrzycę. Występowanie zwiększonej liczebności osobników u diabetyków było niezależne od wieku badanych osób [15]. Gökçe i wsp. [14] przebadali 69 pacjentów ze zdiagnozowaną cukrzycą typu 2 w wieku 25-79 lat. Ustalili, że częstość występowania nużeńca u chorych jest wysoka i wynosi 24,6% (17 pacjentów ze zdiagnozowaną obecnością *D. folliculorum*). Dodatkowo wykazali oni, że osoby z niekontrolowaną cukrzycą są szczególnie wrażliwe na inwazję. Gökçe i wsp. [14] badali pacjentów przy użyciu metody standaryzowanej biopsji powierzchni skóry (SSSB -ang. *standardized skin surface biopsy*). Trzydzieści osiem osób z grupy badanej stanowiły kobiety, a 31 mężczyzn. Spośród 69 pacjentów, 27 osób miało dobrze kontrolowany poziom glukozy (HbA1c≤7%), natomiast 42 pacjentów miało źle kontrolowaną glikemię (HbA1c>7%) [14]. Inwazje częściej dotyczyły kobiet niż mężczyzn (13 kobiet, 4 mężczyzn) [14]. Nie wykazano natomiast znaczących różnic pod względem wieku, masy ciała oraz wskaźnika BMI [14].

Kurt i wsp. [16] badali pacjentki z cukrzycą ciężarnych. Cukrzyca ciężarnych, która dotyczy 6-7% kobiet w ciąży, to stan chorobowy, którego patogeneza związana jest z nietolerancją węglowodanów [16]. Cukrzyca zwiększa ryzyko wystąpienia wielu zaburzeń w organizmie pacjentek, m.in. stanu przedzręczawkowego, makrosomii płodu, może także spowodować konieczność przeprowadzenia cesarskiego cięcia [16]. Celem pracy badawczej Kurt i wsp. [16] było zbadanie częstości występowania nużeńca u pacjentek z cukrzycą ciężarnych oraz wpływu regulacji stężenia glukozy we krwi na poziom intensywności inwazji roztoczem *Demodex* spp. W badaniu wzięły udział 33 pacjentki z cukrzycą ciężarnych oraz 30 zdrowych kobiet (grupa kontrolna). Istotnym podziałem grupy badawczej był podział pacjentek z cukrzycą wyrównaną (19 kobiet) oraz niewyrównaną (14 kobiet) [16]. Zważywszy na fakt, że *Demodex* spp. uważany jest za część flory fizjologicznej skóry, Kurt i wsp. [16] określili dużą intensywność inwazji *Demodex* spp. na więcej niż 5 osobników/cm<sup>2</sup>. Biopsja skóry wykazała obecność osobników nużeńca u 8 pacjentek (24,2%) i tylko u 1 osoby (3,3%) z grupy kontrolnej. Wyniki badań dowiodły, iż w przypadku cukrzyki ciężarnych duża intensywność inwazji *Demodex* spp. występowała częściej. Dodatkowo, większą grupę pacjentek z dużą intensywnością inwazji stanowiły kobiety z cukrzycą niewyrównaną (6/19), niż w grupie z cukrzycą wyrównaną (2/14). W oparciu o uzyskane wyniki można podejrzewać, że zwiększony poziom

inwazji nużeńcem był związany z zaburzeniami metabolizmu glukozy u kobiet z cukrzycą ciężarnych, przede wszystkim z jej niewyrównaną postacią [16].

W badaniu przeprowadzonym przez Mutlu i Cengiz [17] również wykazano korelację między cukrzycą, a inwazją nużeńcem. Materiał został pobrany od 50 pacjentów chorych na cukrzycę, następnie zbadany mikroskopowo i porównany z grupą kontrolną, obejmującą 75 osób zdrowych. Próbka była uważana za dodatnią, jeśli stwierdzono  $\geq 5$  roztoczy/1 cm<sup>2</sup>. Wyniki pokazały, że wśród wszystkich próbek pozyskanych od pacjentów z cukrzycą 22% było dodatnich, jednocześnie w grupie kontrolnej wartość ta wynosiła 5,3%. Dane te, podobnie jak wyniki innych omówionych badań, sugerują znaczący związek między cukrzycą, a wystąpieniem inwazji *Demodex* spp. [17].

#### Choroby nowotworowe

Obecnie coraz więcej dowodów sugeruje znaczącą korelację częstości występowania inwazji *D. folliculorum* i *D. brevis* u pacjentów z chorobą nowotworową [18]. Badania zajmujące się oceną tej zależności dotyczą m.in. czerniaka skóry, nowotworów układu moczowego, przewodu pokarmowego, raka piersi, raka płuc oraz raka podstawnkomórkowego powieki.

Sönmez i wsp. [18] przeprowadzili badania w grupie 101 pacjentów (w wieku 38-82 lat). U 77 (76,2%) chorych na nowotwór została stwierdzona obecność *Demodex* spp.. Nużeńca wykryto u 18 (47,4%) spośród 38 pacjentów z rakiem piersi, 7 (29,2%) z 24 z rakiem płuc, 5 (18,5%) spośród 27 pacjentów z nowotworami przewodu pokarmowego oraz 2 (16,7%) z 12 pacjentów z nowotworami układu moczowego. Wyniki badań wskazały na znaczące różnice pomiędzy występowaniem *Demodex* spp., a rodzajem nowotworu oraz większą częstością jego występowania w grupie pacjentów chorych na raka piersi [18]. Nie odnotowano istotnej korelacji między częstością inwazji, a płcią oraz wiekiem. Należy wspomnieć, że chorzy na raka mieli wyższe wartości BMI (65,4%), a nadmierna masa ciała znacząco korelowała z wystąpieniem inwazji *Demodex* spp. [18]. Erbağci i wsp. [19] założyli natomiast, że *D. folliculorum* i *D. brevis* mogą także pełnić etiopatogenetyczną rolę w rozwoju raka podstawnkomórkowego skóry (BCC – ang. *basal cell carcinoma*). Faktem, który za tym przemawia, jest obecność nużeńca w tych samych obszarach, w których najczęściej ujawnia się BCC, tj. regiony twarzy: czoło, nos, powieki. Zespół przeprowadził badania 142 próbek skóry, 94 z nich pochodziły od pacjentów ze stwierdzonym BCC, natomiast 48 stanowiły próbki od zdrowych osób. Wyniki wskazały, że średnia liczba osobników nużeńca była istotnie wyższa w przypadkach BCC (44,68%) w porównaniu do grupy kontrolnej (25%). Co ciekawe, *D. folliculorum* był wykrywany częściej niż *D. brevis*, zarówno w grupie kontrolnej, jak i badanej. Obecność *D. folliculorum* wykazano w 25 przypadkach BCC i u 10 osób zdrowych. *D. brevis* był obecny u 10 osób z BCC i u 2 osób z grupy kontrolnej. Co więcej, tylko w przypadku 7 pacjentów z rakiem podstawnkomórkowym skóry i u jednej osoby zdrowej wykazano zarażenie mieszane.

Erbağci i wsp. [19] sugerują, że inwazja nużeńcem może przyczyniać się do wystąpienia immunosupresji, a w dalszej konsekwencji do rozwoju raka u osób starszych, które wykazują obniżoną od-

porność. Z drugiej strony, spadek reaktywności immunologicznej może powodować niezależnie zwiększoną tendencję do występowania roztoczy *Demodex* spp. oraz do rozwoju BCC [19].

W innym badaniu, przeprowadzonym przez Mutlu i Cengiz [17], w którym brało udział 50 pacjentów z rakiem, a grupę kontrolną stanowiło 75 osób zdrowych, również zauważono korelację między występowaniem choroby, a inwazją nużeńcem. Każdy pacjent i osoba z grupy kontrolnej zostały poddane biopsji powierzchni skóry, a próbki były badane mikroskopowo przy powiększeniach  $\times 100$  i  $\times 400$ . Próbka została uznana za dodatnią, jeśli stwierdzono  $\geq 5$  osobników/1 cm<sup>2</sup>. Wyniki pokazały, że wśród wszystkich próbek pacjentów z rakiem 26% było dodatnich, jednocześnie w grupie kontrolnej wartość ta wynosiła 5,3%. Wyniki sugerują więc znaczący związek między rakiem, a występowaniem inwazji *Demodex* spp. [18].

Obecność roztoczy z rodzaju *Demodex* oraz objawy przez nie powodowane mogą mylnie sugerować diagnozę w kierunku nowotworów. Galea i wsp. [30] opisali przypadek 60-letniego pacjenta z uogólnioną egzemą oraz obustronnym zapaleniem brzegów powiek. Nieskuteczność konwencjonalnego leczenia antybiotykoterapią oraz objawy sugerowały raka gruczołów łojowych (SGC; *sebaceous gland carcinoma*). SGC powstaje z gruczołów łojowych przydatków oka i może objawiać się jako guzek, owrzodzenie lub nawracające zapalenie brzegów powiek [20]. Szersza diagnostyka u omawianego pacjenta wykluczyła SGC, ale potwierdziła obecność *Demodex* spp. jako przyczynę stanu chorobowego.

#### Leczenie

W zwalczaniu demodekozy nie istnieją standaryzowane schematy leczenia. Najczęściej stosuje się leczenie miejscowe, które niestety nie zawsze okazuje się skuteczne. Zespół z Uniwersytetu Mansoura w Egipcie, przedstawił interesujące wyniki badań leczenia inwazji nużeńcem ludzkim [21]. Salem i wsp. [21] zajęli się oceną skuteczności leczenia demodekozy oczu oraz skóry przy użyciu iwermektyny i jej połączenia z metronidazolem w terapii skojarzonej. W badaniu wzięło udział 120 pacjentów, u których zaobserwowano zmiany skórne obejmujące także powieki, natomiast stwierdzona inwazja *D. folliculorum* była oporna na dotychczasowe leczenie. Co więcej, wybrano tylko te osoby, u których zagęszczenie osobników nużeńca ludzkiego wynosiło więcej niż 5 roztoczy/1 cm<sup>2</sup> dla zmian skórnych, a u podstawy każdej z rzęs – co najmniej 3 osobniki. Metodą detekcji nużeńca była standaryzowana biopsja powierzchni skóry (SSSB). Schemat leczenia skojarzonego został wybrany zważywszy na fakt, że wcześniej publikowane badania wykazały, iż iwermektyna nie jest w stanie całkowicie wyeliminować infekcji *D. folliculorum*, a tylko zmniejszyć liczbę osobników, natomiast metronidazol okazał się lekiem, który zmniejszał stan zapalny, ale nie przyczyniał się do zmniejszenia liczby osobników [21]. Zgodnie z założeniem, wyniki wskazały na różnicę w skuteczności leczenia dwoma przedstawionymi sposobami i przedstawiały się następująco: w podgrupie terapii skojarzonej (iwermektyna z metronidazolem) u 1,7% pacjentów nie wykazano poprawy klinicznej, u 26,7% wykazano znaczną poprawę kliniczną, a 71,6% pacjentów zostało całkowicie wyleczonych. Natomiast w przypad-

ku leczenia wyłącznie iwermektyną, u 27 pacjentów zaobserwowano roztocza w liczbie powyżej 5/1 cm<sup>2</sup>. W grupie leczonej tym sposobem 21,7% nie wykazało pozytywnych skutków leczenia, u 33,3% zaobserwowano znaczną poprawę, a u 45% pacjentów stwierdzono całkowitą remisję. Podsumowując – oba schematy leczenia wykazały wysoki poziom skuteczności, natomiast lepsze efekty terapeutyczne zaobserwowano w leczeniu demodekozy terapią skojarzoną.

Metronidazol to lek powszechnie stosowany w przypadku demodekozy. Wykorzystywane są m.in. maści na bazie metronidazolu, które zawierają również kwas borowy, siarczan cynku, parafinę oraz wazelinę jako substancje pomocnicze [22]. W leczeniu zastosowanie znajdują również maści zawierające żółty tlenek rtęci, preparat Demoxoft, w składzie którego można znaleźć olejek eteryczny z szalwi hiszpańskiej i wyciąg z aloesu oraz olejek z drzewa herbacianego, którego skuteczność wykazali Gao i wsp. [23], stosując metodę masażu z użyciem olejku o stężeniu 5%. W badaniu tym 24 pacjentów, którzy zmagali się ze świądem oczu związanym z inwazją nużeńcem, 16 chorych zostało całkowicie pozbawionych świądu, a u pozostałych 8 stwierdzono zmniejszenie objawów.

Wszystkie powyższe preparaty wykazały działanie łagodzące objawy związane z inwazją nużeńcem oraz zmniejszenie populacji *D. folliculorum* [22]. Zbadano skuteczność leczenia demodekozy przy użyciu maści na bazie metronidazolu oraz maści zawierającej tlenek rtęci. Materiał pobrany od pacjentów z rzęs oka lewego i prawego oceniano przy użyciu mikroskopu świetlnego. Obecność nużeńców w pobranym materiale określana była jako wyniki dodatni. Do leczenia maścią z tlenkiem rtęci włączono 49 pacjentów, natomiast do grupy leczonej metronidazolem 42 osoby. Skuteczność leczenia była oceniana na podstawie stwierdzenia braku obecności nużeńców w pobranym materiale od pacjenta podczas pierwszego lub kolejnego badania kontrolnego. Wykazano, że maść z tlenkiem rtęci okazała się znacznie skuteczniejsza (37%) niż maść na bazie metronidazolu (10%) [22].

Wcześniej wspomniane badania Gao i wsp. [23] zostały przeprowadzone na pacjentach, u których mikroskopowo potwierdzono obecność *D. folliculorum*. Następnie byli oni leczeni przez cztery tygodnie przez stosowanie masażu skóry przy użyciu maści z chlorowodorkiem chlorotetracykliny (CHEO). W przypadku, kiedy nie obserwowano poprawy, dalsze leczenie obejmowało stosowanie masażu skóry przy użyciu 5% olejku z drzewa herbacianego (TTOO, ang. *tea tree oil ointment*) przez kolejne cztery tygodnie. Po czterotygodniowym leczeniu CHEO nie wykazano znaczącej różnicy w objawowym świądzie. Dodatkowo pacjenci mieli sporadycznie występujący łupież cylindryczny rzęs. Sytuacja znacząco się polepszyła po dalszym leczeniu 5% TTOO. Zaobserwowano znaczne zmniejszenie świądu, łupież został zredukowany, a liczba osobników nużeńca u 11 pacjentów zmalała do zera. Można przypuszczać, że metoda aplikacji olejku poprzez masaż okazała się bardzo pomocna w uzyskaniu pozytywnych rezultatów badania.

### Diagnostyka

Metody wykrywania obecności nużeńców oraz pobierania materiału do badań są możliwe z użyciem typowego wyposażenia laboratorium i nie należą do skomplikowanych.

### Metody pobierania materiału

Jedną z nieinwazyjnych metod pobierania materiału do badań jest powierzchniowa biopsja skóry. Kligman i Christensen [24] zalecają umycie skóry twarzy, następnie umieszczenie na jednym końcu plastikowego szkiełka mikroskopowego o wymiarach 1 × 3 cale (2,54 cm × 7,62 cm) 1 kropli kleju cyjanoakrylowego i rozprowadzenie go równomiernie. Szkiełko następnie dociska się do przyśrodkowej części policzka, powodując równomierne rozprowadzenie kleju do połowy długości szkiełka [24]. Pozostaje ono na miejscu przez 5 minut, aby klej cyjanoakrylowy uległ polimeryzacji. Ostatnim etapem jest usunięcie przyklejonego do skóry twarzy szkiełka. Procedura ta powoduje minimalny dyskomfort oraz rumień. Pobrany materiał umieszcza się pod mikroskopem stereoskopowym w celu określenia ilości roztoczy i oznaczenia ich gęstości na 1 cm<sup>2</sup> [24].

Innym stosowanym materiałem do badań są zeszkrobiny naskórka. Postępowanie diagnostyczne opiera się na przeszukiwaniu pod mikroskopem preparatów sporządzonych z zeszkrobiny pobranej ze zmienionych miejsc skóry [25]. W metodzie tej w celu prześwietlenia badanego materiału wykonuje się macerację zeszkrobin naskórka poprzez umieszczenie ich na szkiełku podstawowym, naniesienie kropli 4-5% roztworu KOH lub NaOH i inkubację przez okres 1 godziny.

Powierzchniowa biopsja skóry może dawać wyniki fałszywie ujemne. Materiał ze skóry można pobrać podobną, jednak szybszą i efektywniejszą metodą. Przed pobraniem materiału z okolicy twarzy należy ścisnąć fałd skórny do momentu ewakuowania części sebum, następnie w pobudzonym miejscu użyć przylepca celofanowego, który należy lekko docisnąć i przenieść wraz z zawartością na szkiełko podstawowe w celu obserwacji mikroskopowej. Ważne jest, aby skóra, z której pobierany jest materiał do badań nie była wcześniej oczyszczana, nie posiadała makijażu oraz innych kosmetyków mogących obniżyć przejrzystość obserwowanej później pod mikroskopem próbki. Metoda ta została opracowana w Zakładzie Biologii Medycznej Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu i jest modyfikacją metody opisywanej przez Kligmana i Christensena [24].

### Metody stosowane w diagnostyce demodekozy

Najbardziej znaną metodą stosowaną w diagnostyce demodekozy jest metoda oparta na przygotowaniu preparatu mikroskopowego i zliczaniu poszczególnych stadiów rozwojowych (larw, nimf, jaj oraz osobników dorosłych) [26]. Kryterium rozpoznania choroby jest liczba osobników nużeńca większa od 5, z obecnymi larwami lub jajami na 1 cm<sup>2</sup> badanego obszaru. W trakcie farmakoterapii demodekozy, obserwacja skuteczności stosowanego leczenia może być sprawdzana poprzez określanie zmiany liczby osobników przypadająca na 1 cm<sup>2</sup> zainfekowanego obszaru skóry [26].

### Techniki z użyciem mikroskopu optycznego

Dzięki swojej prostocie, metody oparte na obserwacji z użyciem mikroskopu świetlnego są wciąż z powodzeniem wykorzystywane w diagnostyce laboratoryjnej. Również w odniesieniu do wykrywalności inwazji nużeńca, mikroskop optyczny to użyteczne narzędzie, wykorzystywane w jednej z metod referencyjnych.

Według Hom i wsp. [27] pobrane do badania próbki rzęs z łupieżem cylindrycznym (CD, ang. *cylindrical dandruff*) są lepszym materiałem diagnostycznym niż losowo pobrane włosy z okolicy prawdopodobnej inwazji *Demodex* spp.. Dodatkowo, użycie fluoresceiny lub alkoholu etylowego poprawia obraz próbek pod mikroskopem [27]. Fluoresceina powoduje natychmiastowe rozpuszczenie i rozciągnięcie materiału, przyczyniając się do znacznego zwiększenia wykrywalności pasożyta. Po zanurzeniu materiału pobranego od pacjentów z CD we fluoresceinie staje się on semitransparentny, co pozwala na łatwiejsze i jakościowo lepsze uwidocznienie struktur wewnętrznych [27]. Użyty alkohol etylowy pomaga w skutecznym potwierdzeniu obecności roztoczy pod mikroskopem. Wadami użycia etanolu okazuje się potrzeba odczekania 20 minut, aż osobniki nużeńca staną się widoczne [27]. Ponadto istnieje ryzyko, że roztocze mogą zostać zabite alkoholem o wysokim stężeniu.

#### Metoda PCR

Dzięki dostępności metod biologii molekularnej możliwe jest izolowanie materiału genetycznego z opisywanych roztoczy. Badania z użyciem łańcuchowej reakcji polimerazy -PCR (ang. *polymerase chain reaction*) umożliwiają zrozumienie różnorodności międzygatunkowej roztoczy z rodzaju *Demodex* spp.. W pracy Palopoliego i wsp. [28] przebadano 70 próbek zawierających DNA roztoczy ludzkich pobranych od osób z różnych części geograficznych świata i przeanalizowano 241 sekwencji genomu mitochondrialnego *D. folliculorum*. Materiał użyty do ekstrakcji DNA został pobrany z czoła (od 31 osób badanych) oraz policzków i fałdów nosowo-wargowych (od 39 osób). Szczegółowe dane dotyczące m.in. pochodzenia przodków i miejsca urodzenia rodziców udało się uzyskać od 39 uczestników badania.

Metoda ekstrakcji DNA z nużeńców opisana przez Palopoliego i wsp. [28] polegała na pobraniu materiału z okolicy czoła i kilkakrotnym przemyciu uzyskanych roztoczy w świeżym oleju mineralnym, który następnie był usuwany poprzez dziesięciokrotne zastosowanie 100% etanolu. Użyty alkohol odparowywano przez ogrzewanie w temp. 95°C w czasie 2 min. Następnie roztocze zawieszano w buforze lizującym, a w dalszych etapach poddawano inkubacji w temp. 65°C przez 60 min. i w temp. 95°C przez 10 min. W kolejnym etapie pobrane osobniki zamrażano w temp. -20°C przez 1 godz. i przechowywano w tej temp. do momentu przeprowadzenia reakcji PCR. Autorzy zaprojektowali primery PCR, które służyły do amplifikacji określonych fragmentów genomu mitochondrialnego *D. folliculorum* [28]. Fragmenty te zawierały 930 bp z genomu mitochondrialnego nużeńca ludzkiego, obejmując większość genu oksydazy cytochromu c III (COIII), cały gen tRNA-Gly oraz początek genu dehydrogenazy NADH 3 (ND3). Użyta przez autorów technika *touch-down* PCR opiera się na zmianie temperatury, w której następuje przyłączenie starterów podczas kolejnych cykli reakcji. Łącznie przeprowadzono 32 cykle. Następnie powstałe produkty PCR były oczyszczane i poddane sekwencjonowaniu.

Pogrupowanie sekwencji roztoczy (n=232) według pochodzenia gospodarzy, z których próbki materiału zostały pobrane, umożliwiło zbadanie wariacji genetycznych w mtDNA nużeńca ludzkiego

w związku z pochodzeniem geograficznym przodków badanych osób. Podział ze względu na położenie geograficzne obejmował Europę, Azję, Afrykę i Amerykę Południową. Badanie PCR umożliwiło wykazanie, iż populacje *D. folliculorum* cechują się stabilnością genetyczną na przestrzeni lat, a co więcej, przedstawiciele pochodzenia azjatyckiego oraz Afroamerykanie są gospodarzami utrzymującymi roztocze poszczególnych linii przez kolejne pokolenia nawet poza regionem geograficznym swojego urodzenia lub pochodzenia [28].

Rojas i wsp. [29] przeprowadzili badanie dotyczące dwóch populacji *D. folliculorum*, wyizolowanych z różnych okolic na ciele człowieka – skóry i mieszków włosowych rzęs. Metoda izolowania DNA genomowego opierała się na wprowadzeniu do badanego materiału odpowiedniego buforu, inkubacji mieszaniny się w 94°C przez 5 min, odwirowaniu i odzyskaniu supernatantu jako matrycy DNA. Sekwencjonowaniu zostały poddane fragmenty 16S oraz gen cytochromu oksydazy I, którego podjednostki amplifikowano metodą PCR z użyciem starterów. W celu weryfikacji, czy klonowanie przebiegło prawidłowo, przeszukiwano jeden do trzech pozytywnych klonów w kierunku wstawki DNA, a następnie przeprowadzono sekwencjonowanie.

Regiony genów, które zostały poddane sekwencjonowaniu, obejmowały regiony 436-bp genu 16S rDNA oraz 453-bp genu cytochromu oksydazy I (COI) i pochodziły od poszczególnych osobników obu populacji roztoczy [29]. Według badaczy, 16S rDNA okazał się nieprzydatnym markerem do wykazania różnic między populacjami, natomiast sekwencje genowe COI wykazały przydatność w zidentyfikowaniu dwóch populacji, które pod względem morfologicznym są trudno rozróżnialne przy użyciu klasycznych metod. Obie populacje wykazywały wiele wspólnych cech charakterystycznych dla *D. folliculorum*, m.in. wielkość, obecność dwóch par krótkich odnóży i długi odwłok, jednakże wykryto również różnice biometryczne i morfologiczne między nimi. Główną różnicą był kształt i długość odwłoka, dłuższy i większy u większości osobników męskich i żeńskich izolowanych z rzęs. Sekwencje COI nie wykazywały polimorfizmu wewnątrz- i zewnątrz-osobniczego. Warto zwrócić uwagę na wartość procentową zmienności COI w badanych populacjach, która była dla tego markera molekularnego wyższa (1,76%) [29]. W oparciu o sekwencje COI z dwóch różnych populacji *D. folliculorum* wyizolowanych ze skóry i rzęs, wykryto specyficzne miejsca rozpoznawalne dla endonukleaz. Okazało się, że enzym restrykcyjny *Pvu2* ma wartość diagnostyczną w oznaczaniu poziomu populacji *D. folliculorum*, ponieważ w odróżnieniu od osobników wyizolowanych ze skóry, u roztoczy pobranych z rzęs zaobserwowano miejsce restrykcyjne w sekwencji COI [28]. Opisane badania mogą wskazywać, że w przebiegu inwazji nużeńcem ludzkim, zasiedlenie poszczególnych miejsc na ciele człowieka przez roztocza *Demodex* spp. może być nieprzypadkowe.

#### Technika HD-OCT

Optyczna koherentna technika w wysokiej rozdzielczości – HD-OCT (ang. *high-definition optical coherence tomography*) to kolejny przykład innowacyjnej techniki, która może zostać użyta w celu detekcji *Demodex* spp. [30]. Jest to nieinwazyjna metoda oparta

na uzyskaniu obrazu przekrojowego skóry, podobna do techniki z zastosowaniem ultradźwięków, jednakże wykorzystująca fale z zakresu bliskiej podczerwieni [30]. HD-OCT zapewnia wysoką rozdzielczość obrazu w czasie rzeczywistym w trybie obrazowania *en-face* (C-scan). System HD-OCT może pracować w dwóch trybach: w czasie rzeczywistym (B-scan) oraz *en-face* (C-scan), a dodatkowo pozwala utworzyć szczegółowe trójwymiarowe obrazy nawet grubych próbek. Ze względu na wielkość roztoczy *Demodex* spp., których średnica wynosi około 35  $\mu\text{m}$ , detekcja może okazać się niemożliwa w przypadku konwencjonalnej metody OCT, taką możliwość zapewnia OCT w wysokiej rozdzielczości [30]. Trudność w identyfikacji nużeńca powyższą techniką stanowi fakt, że osobniki w pęcherzykach są ułożone w orientacji pionowej, natomiast obraz wędrujących larw często jest niewidoczny. Należy podkreślić, że badanie jest nieinwazyjne, a wizualizacja natychmiastowa, co jest zdecydowaną zaletą w porównaniu do tradycyjnych metod diagnostycznych.

### Epidemiologia

Palopoli i wsp. [28] w swoich badaniach podjęli się próby oceny globalnego występowania i różnic w materiale genetycznym *Demodex* spp. pochodzącego od nosicieli z różnych regionów świata. Jak opisano powyżej, wykazano, że populacje *D. folliculorum* są stabilne genetycznie w ciągu lat i gospodarze pochodzenia azjatyckiego oraz Afroamerykanie utrzymują roztocze poszczególnych linii przez lata, a nawet pokolenia poza regionem geograficznym swojego urodzenia. Badacze zauważyli również wyższe prawdopodobieństwo występowania haplotypów *Demodex* spp. w obrębie rodzin niż u osób niespokrewnionych ze sobą, co wskazuje na konieczność bliskich kontaktów w celu rozprzestrzeniania się roztoczy [28]. Dowiedziono ponadto, że nużeniec ludzki nie został znacznie dotknięty przez tzw. „efekt wąskiego gardła” w niedawnej dla ludzkości przeszłości. Ewolucyjna historia *D. folliculorum* odzwierciedla historyczne wzorce ludzkich migracji. Wyróżniono 4 klasy haplotypów (A, B, C, D) [28]. Klasy zostały podzielone według powtarzających się sekwencji genetycznych, które były zbliżone lub identyczne u przedstawicieli z poszczególnych regionów geograficznych. Gospodarze pochodzenia europejskiego posiadają roztocze reprezentujące wyłącznie klasę D, natomiast u przedstawicieli Afryki, Azji i Ameryki Południowej popularne były klasy A i B [28]. Osobniki prezentujące klasę C stanowiły większość u przedstawicieli Afryki i Ameryki Południowej. Powyższe powiązania potwierdzają hipotezę, że badania filogenetyczne nad osobnikami z rodzaju *Demodex* są rzetelnym źródłem badań nad przeszłością oraz powiązaniem między populacyjnymi.

### Podsumowanie

Nużeniec i powodowane przez nie dolegliwości to stosunkowo niedawno poznany problem. Wiele chorób i schorzeń jest powiązanych z tym pasożytniczym roztoczem. Diagnostyka *Demodex* spp. jest stosunkowo prosta i pozwala na wykorzystanie różnych metod, które nie są jednak w większości przypadków wystandaryzowane i szeroko rozpowszechnione.

### Piśmiennictwo

1. Rusiecka-Ziółkowska J, Nokił M, Fleischer M. Demodex – an old pathogen or a new one? Adv Clin Exp. 2013; 23(2): 295-298.
2. Gao Y, Di Pascuale M, Li W, et al. High prevalence of Demodex in eyelashes with cylindrical dandruff. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005; 46(9): 3089-3094.
3. Hadaś E, Derda M. Pasożyty – zagrożenia nadal aktualne. Probl Hig Epidemiol. 2014; 95(1): 6-13.
4. Jarmuda S, O'Reilly N, Żaba R, et al. Potential role of Demodex mites and bacteria in the induction of rosacea. J Med Microbiol. 2012; 61(11): 1504-1510.
5. Coston T. *Demodex folliculorum* blepharitis. Trans Am Ophthalmol Soc. 1967; 65: 361.
6. Lacey N, Kavanagh K, Tseng S. Under the lash: Demodex mites in human diseases. Biochem. (Lond) 2009; 31(4): 2-6.
7. Marcinowska Z, Kosik-Bogacka D, Łanocha A, et al. Occurrence *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* among inhabitants of north-western Poland. Diagn Lab. 2013; 49(3): 195-199.
8. Baima B, Sticherling M. Demodicidosis revisited. Acta Derm Venereol. 2002; 82: 3-6.
9. Moravvej H, Dehghan-Mangabadi M, Abbasian M, et al. Association of rosacea with demodicosis. Arch Iran Med. 2007; 10(2): 199-203.
10. O'Reilly N, Menezes N, Kavanagh K. Positive correlation between serum immunoreactivity to Demodex-associated *Bacillus* proteins and erythematotelangiectatic rosacea. Br J Dermatol. 2012; 167(5): 1032-1036.
11. Forton F M. Papulopustular rosacea, skin immunity and *Demodex*: pityriasis folliculorum as a missing link. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2012; 26(1): 19-28.
12. Smith O J, Ross G L. Variations in the anatomy of the posterior auricular nerve and its potential as a landmark for identification of the facial nerve trunk: a cadaveric study. Anat Sci Int. 2012; 87: 101-105.
13. Ölt S, Yalçın G G, Uysal O S, et al. *Demodex* spp. Infestation in a breast-cancer patient: A case report. Niger Med J. 2013; 54(5): 349-350.
14. Gökçe C, Aycan-Kaya Ö, Yula E, et al. The effect of blood glucose regulation on the presence of opportunistic *Demodex folliculorum* mites in patients with type 2 diabetes mellitus. J Int Med Res. 2013; 41(5): 1752-1758.
15. Clifford CW, Fulk GW. Association of diabetes, lash loss, and *Staphylococcus aureus* with infestation of eyelids by *Demodex folliculorum* (*Acari: Demodicidae*). J Med Entomol. 1990; 27(4): 467-470.
16. Kurt R, Aycan Kaya Ö, Karateke A et al. Increased density of *Demodex folliculorum* mites in pregnancies with gestational diabetes. Med Princ Pract. 2014; 23(4): 369-372.
17. Mutlu F, Cengiz Z. *Demodex* species positivity among patients with cancer, on hemodialysis and with diabetes mellitus. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2017; 48(3): 532-537.
18. Sönmez Ö, Yalçın Z, Karakeçe E, et al. Associations between *Demodex* species infestation and various types of cancer. Acta Parasitol. 2013; 58(4): 551-555.
19. Erbağcı Z, Erkiñç S. Basal cell carcinoma and demodicidosis: Is there an etiologic or coincidental relationship? Turkish Journal of Cancer. 2000; 30: 111-118.
20. Galea M, Sharma R, Srinivasan S, Roberts F. *Demodex* blepharitis mimicking eyelid sebaceous gland carcinoma, Journal of Clinical and Experimental Ophthalmology. 2014; 42(2): 208-210.
21. Salem D, El-Shazly A, Nabih N, et al. Evaluation of the efficacy of oral ivermectin in comparison with ivermectin-metronidazole combined therapy in the treatment of ocular and skin lesions of *Demodex folliculorum*. Int J Infect Dis. 2013; 17: 343-347.

22. Sędzikowska A. Demodicosis – pathophysiology, treatment and therapeutic efficacy of metronidazole ointment and mercury oxide ointment. *Ophthalmotherapy*. 2014; 1(2): 108-113.
23. Gao Y-Y, Xu D, Huang I, et al. Treatment of ocular itching associated with ocular demodicosis by 5% tea tree oil ointment. *Cornea*. 2012; 31(1): 14-17.
24. Kligman A M, Christensen M S. *Demodex folliculorum*: requirements for understanding its role in human skin disease. *J Invest Dermatol*. 2011; 131(1): 8-10.
25. Cielecka D, Salamatin R, Garbacewicz A. Zastosowanie płynu Hoyer'a do diagnostyki i badań morfologicznych niektórych pasożytów. *Wiadomości Parazytologiczne*. 2009; 55(3): 265-270.
26. Kubanov A, Yulia G, Grevtseva A. Important aspects of *Demodex* diagnostics. *Journal of Surgical Dermatology*. 2016; 1(1): 43-51.
27. Hom M, Mastrotta K, Schachter S. *Demodex*. Clinical cases and diagnostic protocol. *Optom Vis Sci*. 2013; 90: 198-205.
28. Palopoli M, Fergus D, Minot S, et al. Global divergence of the human follicle mite *Demodex folliculorum*: Persistent associations between host ancestry and mite lineages. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2015; 112(52): 15958-15963.
29. Rojas M, Riazco C, Rocio C, et al. Molecular study on three morphotypes of *Demodex* mites (*Acarina: Demodicidae*) from dogs. *Parasitol Res*. 2012; 111(5): 2165-2172.
30. Maier T, Sattler E, Braun-Falco M, et al. High-definition optical coherence tomography for the *in vivo* detection of *Demodex* mites. *Dermatology*. 2012; 225(3): 271-276.

**Autor do korespondencji:**

dr hab. n. med. Karolina Szewczyk-Golec  
Katedra Biologii i Biochemii Medycznej, CM UMK  
85-092 Bydgoszcz, ul. Karłowicza 24,  
Tel. +48 52 5853737  
e-mail: karosz@cm.umk.pl

Otrzymano: 29.11.2017

Akceptacja do druku: 4.04.2018

Nie zgłoszono sprzeczności interesów