

INTERDISZIPLINÄRE ZEITSCHRIFT FÜR ALLERGOLOGIE UND UMWELTMEDIZIN

ALLERGO

Organ der Deutschen Gesellschaft für
Allergologie und klinische Immunologie

DGAI

Organ des Ärzteverbandes
Deutscher Allergologen

ÄDA

JOURNAL

INTERDISCIPLINARY JOURNAL OF ALLERGY AND ENVIRONMENTAL MEDICINE

Sonderdruck

13/2004, S. 269–273

Kontrolle der Hausstaubmilbe,
Dermatophagoides farinae, durch
Wirkstoffe aus dem Samen des Neem-
baums, *Azadirachta indica* A. Juss.

HEINZ REMBOLD¹, HOLGER OETZEL²

URBAN & VOGEL
MEDIEN UND MEDIZIN VERLAGSGESELLSCHAFT

Kontrolle der Hausstaubmilbe, *Dermatophagoides farinae*, durch Wirkstoffe aus dem Samen des Neembauums, *Azadirachta indica* A. Juss.

HEINZ REMBOLD¹, HOLGER OETZEL²

¹Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried; ²Ingenieurbüro H. Oetzel, Kassel

Zusammenfassung

Hintergrund: Neben Akariziden auf der Basis von Benzylbenzoat, mit ihren teils kritisch beobachteten Nebenwirkungen, sind frei verkäufliche Produkte auf der Basis von Neemöl (Margosaöl) auf dem Markt. Mit der vorliegenden Untersuchung sollten die Wirksamkeit und Wirkungsweise von sieben dieser Produkte gegen die Hausstaubmilbe unter standardisierten Laborbedingungen überprüft werden.

Methoden: Sechs auf Inhaltsstoffen des Neemsamens basierende Produkte (Biomal, Gallina, Milbiol, Neemol, Spinnrad und TN-MP 100) wurden in einem standardisierten Testverfahren auf ihre Langzeitwirkung gegen die Hausstaubmilbe *Dermatophagoides farinae* untersucht. Ferner wurde das wirksamste Produkt Milbiol mit dem angeblichen Neemakarizid Nimbasan und mit Benzylbenzoat als etabliertem Akarizid verglichen.

Ergebnisse: Alle Neempräparate zeigten keine akarizide, also akut toxische Wirkung, wohl aber

in dem über 14 Wochen laufenden Langzeittest einen unterschiedlich stark ausgeprägten entwicklungshemmenden Effekt. Nur Milbiol, gefolgt von TN-MP 100, war in der Lage, die Milbenpopulation während der gesamten Versuchszeit von vier bis fünf Generationen auf einem extrem niedrigen Niveau zu halten. Die anderen vier handelsüblichen Neemprodukte verlangsamten das Milbenwachstum mehr oder weniger stark. Das Neemprodukt Nimbasan zeigte, ebenso wie Milbiol, im Gegensatz zum Benzylbenzoat keine akarizide Wirkung.

Schlussfolgerung: Nach diesen Ergebnissen ist von den untersuchten Handelsprodukten Milbiol aufgrund seiner andersartigen Wirkungsweise eine echte und hochwirksame Alternative zu den etablierten Akariziden für eine wirksame Kontrolle der Hausstaubmilbe. Es wird nun Aufgabe einer plazebokontrollierten klinischen Studie sein, die Langzeitwirkung auf atopische Patienten zu klären.

Control of the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*, by biologically active seed components of the neem tree, *Azadirachta indica* A. Juss.

Schlüsselwörter

Akarizid – alternative Milbenkontrolle – Hausstaubmilbe – Hausstaubmilbenallergie – Margosaöl – Milbiol – Neemöl – TN-MP 100

Summary

Background: For house dust mite control most of the presently used acaricides are based on benzyl benzoate. These synthetics are under critical observation, however, due to some side effects. As an alternative control method, formulations based on neem (margosa) oil are available as over-the-counter (OTC) products. This study was undertaken

with seven products to elucidate their effectiveness and mode of action against the house dust mite, when tested under standardized laboratory conditions.

Methods: Six marketable neem-based products (Biomal, Gallina, Milbiol, Neemol, Spinnrad, and TN-MP 100) were tested for their long-term effects on survival of the house dust mite under standardized laboratory conditions. Glass dishes, 7 cm in diameter, containing 0.25 g of a mixture of mite-free house dust and protein, were incubated in a self-designed thermostat of 0.055 m³ volume under controlled conditions of light, air,

Korrespondenzanschrift/Correspondence to

Prof. Dr. Heinz Rembold
Wolfratshauser Straße 68A
81379 München
E-Mail: rembold@terra-nostra-gmbh.de

Eingang/Reviewed

30. Juli 2003
Annahme/Accepted
19. Dezember 2003

Key words

Acaricide –
alternative mite
control – house
dust mite –
house dust
mite allergy –
margosa oil –
Milbiol – neem
oil – TN-MP 100

temperature, and humidity. Each of the dishes was inoculated with 200 mites collected from a randomized culture and with 50 eggs. After 12 h preincubation, the contents were evenly sprayed with the test substance in a dose of 20 ml/m². Each of the products was tested in four to six replicates. All dishes were controlled weekly for living mites. The test was terminated after 14 weeks, and the average number of surviving mites was recorded. The most effective product, Milbiol, was also tested for its acaricidal effect in comparison with Nimbasan, a recently marketed neem-based acaricide, and with benzyl benzoate, the chemical most widely used to control house dust mite populations.

Results: Out of the tested products, only Milbiol, followed by TN-MP 100, could effectively control the mite population over a period of four to five

generations. The other four neem products could more or less slow down growth and development of the mite populations if compared with the control group, without keeping them below the starting number, though. One of the neem products, Nimbasan, is marketed as a biological acaricide. Neither this product nor Milbiol, however, showed any acaricidal effects if compared with benzyl benzoate.

Conclusion: These laboratory tests together with first field studies by Oetzel (1997) clearly prove that Milbiol is highly effective in the long-term control of the house dust mite. Due to its feeding deterrence, its mode of action is completely different as compared with the acaricide benzyl benzoate. Placebo-controlled clinical studies of atopic patients should be conducted in order to clarify the long-term effect on house dust mite allergy.

Einleitung

Allergene der Hausstaubmilben *Dermatophagoides farinae* und *D. pteronyssinus* sind beim Menschen eine der häufigsten Ursachen für allergische Symptome wie Asthma, allergische Rhinitis oder atopische Dermatitis. Zwei immunologisch wichtige Gruppen von Glykoproteinen, d1 und d2, finden sich nicht nur im Körper, sondern vor allem auch im Kot der Milben und nach dessen Austrocknen und Zerfall zusammen mit Hausstaub in der Atemluft. In den Industrieländern geht man von einer Prävalenz der atopischen Krankheiten von 15–20% aus, wobei mehr als die Hälfte der Patienten unter einer Hausstaubmilbenallergie leidet. Die Hausstaubmilbe vermehrt sich bei einer relativen Feuchtigkeit von > 65% und einer Temperatur von > 25 °C. Damit erklärt sich ihr mit bis zu 80% hauptsächliches Vorkommen in regelmäßig benutzten, also feuchtwarmen Matratzen und in sonstigem Bettzeug sowie zu etwa 20% in Polstermöbeln. Neben verschiedenen physikalischen Methoden zur Reduzierung der Milbenpopulation, wie Staubsaugen, Lüften, Behandlung der Textilien durch Waschen oder durch ein „Encasing“ der Matratzen mit einer feinporigen Plastikfolie, interessiert hier die chemische Bekämpfung der Milben mit Akariziden. Hierzu werden vor allem Präparate auf der Basis von Benzylbenzoat verwendet, seltener Gerbsäure oder Salze der Borsäure, diese auch gelegentlich in Mischung miteinander. Zur ausführlichen Darstellung der Hausstaubmilbenallergie wird auf die Übersichten von Platts-Mills und Chapman [3] sowie Schnyder et al. [8] verwiesen. Neben den für die Milben akut toxischen Akariziden, die im Fall des Benzylbenzoats zu einer signifikanten Reduzie-

rung des Milbenbefalls führen [1], bietet sich ein zweiter Weg an, welcher über eine Verhaltensänderung der Milben zu deren allmählichem Absterben führt. Inhaltsstoffe des Neembaums, *Azadirachta indica* A. Juss., verändern das Wachstum und die Entwicklung von Insekten, ohne für den Menschen schädlich zu sein [6, 7]. Vorversuche mit einer Neemölformulierung TN-MP 100 [2] zeigten überraschenderweise, dass deren Inhaltsstoffe nicht nur auf Insekten, sondern auch auf die Hausstaubmilbe eine stark entwicklungshemmende Wirkung ausüben.

Die vorliegende Untersuchung hatte zum Ziel, den erwähnten Vorversuch und damit auch die Haltbarkeit der inzwischen fünf Jahre gelagerten Formulierung TN-MP 100 abzusichern und mit verschiedenen handelsüblichen Neemprodukten in einem vier bis fünf Milbengenerationen überdeckenden Langzeitversuch unter standardisierten Laborbedingungen zu prüfen. Außerdem wurde ein kürzlich auf den Markt gebrachtes Produkt, welches Neeminhaltsstoffe enthält und nach Angabe des Herstellers akarizid wirken soll, im Kurzzeitversuch mit dem etablierten Akarizid Benzylbenzoat verglichen.

Material und Methoden**Milbenzucht**

Es wurde eine Mischkultur aus drei Zuchtansätzen von *Dermatophagoides farinae* verwendet. Die Milben wurden in Spezialgefäßen auf einem eiweiß- und stärkehaltigen Futter in einem Exsikkator bei Raumtemperatur und bei 80% relativer Luftfeuchte 30 Tage lang angezogen. Aus diesem Ansatz wurden Milben und Milbeneier in die Testproben eingesetzt.

Prüfsystem

Das Prüfverfahren wurde in Anlehnung an die ISO-Richtlinien AFNOR NF G39-011 durchgeführt. In selbst entwickelten Klimaschränken von 0,055 m³ Inhalt mit durchsichtigen Außenseiten wurde eine kontinuierlich auf- und abfahrende Luftfeuchtigkeit von 65–80% rF durch eine wässrige 60%ige Kochsalzlösung eingestellt. Die Temperatur wurde mithilfe einer Metallflächenheizung auf 24 °C gehalten. Die Konstanz dieser Bedingungen wurde durch Luftumwälzung und über Sensoren kontrolliert, welche rechnergesteuert überschießende Feuchtigkeits- und Temperaturwerte durch Zufuhr von Frischluft regulierten. Die Konstanz von Temperatur und Feuchtigkeit wurde während der gesamten Versuchszeit registriert.

Es wurden gläserne Petrischalen mit 7 cm Durchmesser und einem speziellen Deckel aus Leichtmetall verwendet, der, mit einem Gummidichtungsring versehen, die Glasschale luftdicht abschließt. Zur Belüftung der Proben besitzt der Deckel in der Mitte eine runde Öffnung von 3 cm Durchmesser, die mit einer Lüftungsmembran aus Polytetrafluorethylen (PTFE) verschlossen ist. Als Substrat für die Milben wurde eine Mischung aus milbenfreiem Hausstaub und ca. 0,25 g Futter pro Schale zugesetzt. In die Schalen wurden jeweils etwa 200 Milben und 50 Eier eingebracht. Maximal 18 Proben wurden pro Klimaschrank eingestellt.

Die verschiedenen Prüfsubstanzen (Tab. 1) wurden in die vorbereiteten, mit Futter und Milben 12 h lang vorinkubierten Gefäße in einer Menge von jeweils 20 ml/m² möglichst gleichmäßig eingesprüht. Von jeder Probe wurden vier bis sechs Schalen, von der Isopropylalkohol-Kontrolle ebenfalls sechs Schalen angesetzt. Dann wurde zur Kontrolle der Kot- und Allergenproduktion im Deckel jeder Schale eine runde Haftscheibe aus Kunststoff (Dicke 0,01 mm, Durchmesser 3 cm) mithilfe eines Klebestreifens so angeklebt, dass sie den Boden berührte und die Milben darüber laufen konnten. Nach Verdampfen des Alkohols wurden die Versuchsgefäße in den Klimaschrank gestellt und wöchentlich auf Mortalität sowie Änderung des Verhaltens der Milben geprüft.

Nach 14 Wochen wurde der Versuch beendet. Die Länge der Versuchsdauer erlaubte auch eine Aussage über die Wirkung der Prüfsubstanzen auf

Tabelle 1

Prüfsubstanzen im Langzeitversuch mit *D. farinae*

| Prüfsubstanz | Anzahl der Proben | Substanz/Hersteller | Konzentration (%) |
|------------------|-------------------|---|-------------------|
| Isopropylalkohol | 6 | Kontrolle | 100 |
| Biomal | 4 | Konzentrierte Wirkstoffe aus Neemöl/Vital 4 You | Keine Angabe |
| Gallina | 4 | Neemöl/Gallina | 0,9 |
| Milbiol | 6 | Neemöl/Hexal | 0,9 |
| Neemol | 4 | Neemöl/HNK-Neubauer | 10 |
| Spinnrad | 4 | Neemöl/Spinnrad | 0,9 |
| TN-MP 100 | 6 | Neemöl/ProMelia | 0,9 |

die Fertilität der Eier. Bei den wöchentlichen Kontrollen wurde in keinem Fall festgestellt, dass alle Versuchstiere gestorben waren. Bei Versuchsende wurden die lebenden Milben über ein kameragestütztes System interpoliert ausgezählt und der Belag auf den Haftscheiben nach dem optischen Eindruck protokolliert.

Neben diesen Untersuchungen zur bioziden, also die Entwicklung der Milben störenden Wirkung des Neemöls wurden zur Prüfung eines akariziden, also die Milben abtötenden Effekts folgende Proben untersucht: Ethyl- und Isopropylalkohol als Kontrollen, Benzylbenzoat (1,5% in Isopropylalkohol), Nimbasan (ASS) mit 0,3% Neemsamenkernextrakt in Ethylalkohol und Milbiol (Hexal). Die Versuchsanordnung entsprach der für den Langzeitversuch beschriebenen und der Versuch wurde nach 60 h beendet.

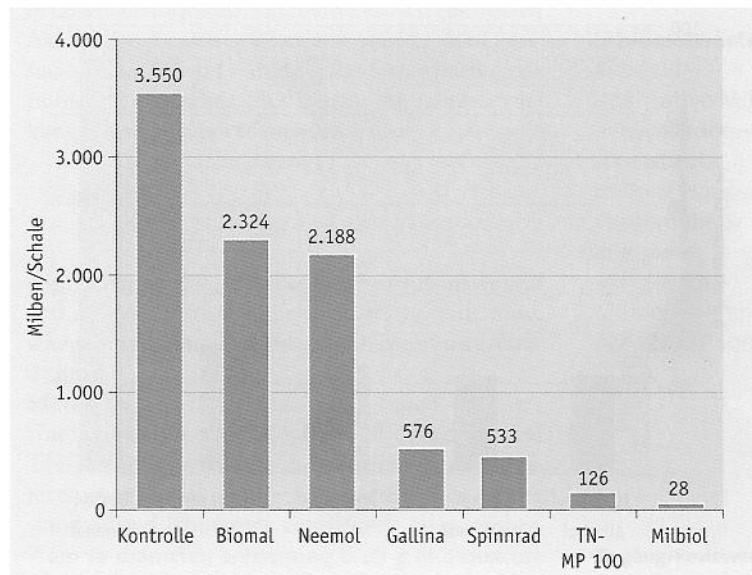


Abbildung 1. Anzahl lebender Milben im Langzeitversuch 60 Tage nach Versuchsbeginn

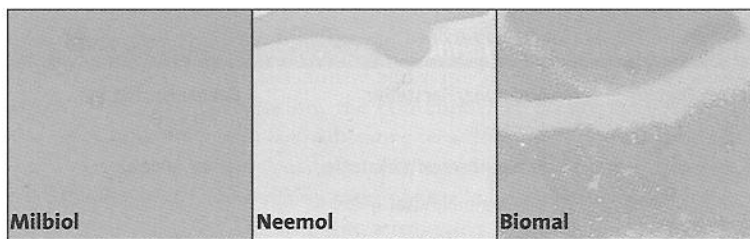


Abbildung 2. Ablagerung von Milbenkot auf Klebefolie. Gezeigt ist ein Ausschnitt der mit mehr oder weniger Milbenkot (hellgraue Fläche) bedeckten Folie am Beispiel von Milbiol (stark wachstumshemmend), Neemol und Biomal (beide schwach wachstumshemmend).

Ergebnisse

Langzeitversuch mit Neempräparaten

Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse des Langzeitversuchs mit insgesamt sechs handelsüblichen Neempräparaten und den Vergleich mit Isopropylalkohol als Kontrolle. Bei einer Anfangsmenge von 200 Milben und 50 Eiern pro Versuchsgefäß war die Population in der Kontrolle mit einem Durchschnitt aus sechs Proben von 3.550 lebenden Milben auf das etwa 15fache angestiegen. Einen gewissen Einfluss auf die Vermehrung zeigten die beiden Neemölformulierungen Biomal und Neemol, auch wenn dieser mit etwa 2.200 lebenden Milben gegenüber der Kontrolle nur gering war. Deutlich stärker wirkten die beiden Neemöle von Gallina und Spinnrad mit etwa 550 lebenden Milben, also etwa einem Siebtel der Kontrollgruppe, aber noch immer mit dem Doppelten der Anfangsmenge. Von einer bioziden Wirkung kann man nur bei den beiden Neemölfor-

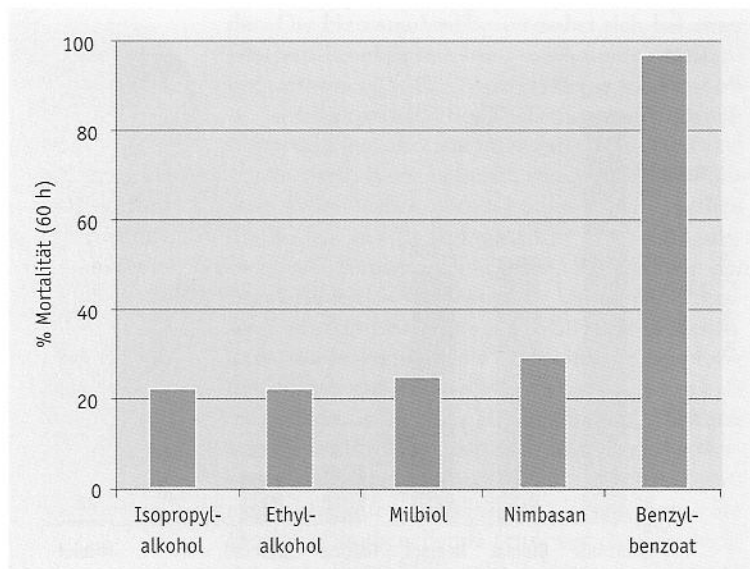


Abbildung 3. Prüfung auf eine akarizide Wirkung von Milbiol und Nimbasan im Vergleich mit Benzylbenzoat. Gezeigt ist die Milbensterblichkeit in Prozent der Anfangsmenge.

mulierungen TN-MP 100 und, noch deutlicher, Milbiol sprechen. Bei Letzterem lag in den sechs Versuchsproben die Milbenzahl zwischen ein und 30 sowie in einem einzigen Fall bei 69.

Die auf der Innenseite der Deckel angebrachten Klebefolien waren mit dem Kot und damit auch mit dem Allergen der darüber gelaufenen Milben bedeckt (Abb. 2). Bei der Kontrollgruppe hatten alle Folien einen dichten Belag, während bei Milbiol fast kein Belag zu sehen war. Die Beläge auf den einzelnen Klebefolien folgten alle dem Effekt, wie er sich bei Versuchsende an der Zahl der lebenden Milben zeigte. Damit war eine zumindest semiquantitative Abschätzung der Wirkung bereits im laufenden Versuch möglich.

Haben Neeminhaltsstoffe akarizide Wirkung?

Das angebliche Akarizid Nimbasan ist in Ethylalkohol gelöst. Als Kontrolle wurde deshalb dieses Lösungsmittel getestet. Von jeder Probe wurden drei Schalen angesetzt und der Versuch wurde über eine Dauer von 60 h verfolgt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3 zusammengefasst und belegt die klar akarizide Wirkung des Benzylbenzoats. Diese zeigte sich nach einer kurzen repellierenden Phase in zwei Schalen bereits innerhalb der ersten 7 h in einer 100%igen und in der dritten mit einer 90%igen Mortalität. Die anderen vier Substanzen, Ethyl- und Isopropylalkohol, Milbiol und Nimbasan, zeigten während eines Zeitraums von 60 h praktisch keine akarizide Wirkung. Ein Vergleich mit der reinen Alkoholbehandlung ergab nur eine geringe Milben abtötende Wirkung (Abb. 3).

Diskussion

Die Untersuchung zeigt, dass im Neemöl (synonym Margosaöl) Stoffe enthalten sind, welche gegen die Hausstaubmilbe *D. farinae* eine deutliche Wirkung entfalten. Sie haben keinen akariziden, also die Milben abtötenden Effekt, sondern beeinflussen offensichtlich deren Vermehrung. Das Ergebnis der Studie sagt aber nichts über den Wirkungsmechanismus dieser Stoffe aus. Deshalb lässt sich auch nicht zwischen einer Wirkung auf adulte Milben bzw. deren Nymphenstadien und einer Wirkung auf die Eier unterscheiden. Ein Vergleich der verschiedenen untersuchten Produkte zeigt ferner große Unterschiede in der Wirkung der eingesetzten Neemölformulierungen. Von den untersuchten Produkten sind nur das TN-MP 100, vor allem aber das Milbiol als dessen Weiterentwicklung mit seiner extrem starken Wirkung von praktischem Interesse. Hier ist bemerkenswert, dass bereits zu Beginn der Versuche die Milben eine deutliche Fluchtreaktion zeigten und die Futteraufnahme verweigerten. Dies könnte der Schlüssel dazu

sein, weshalb das Produkt bei der üblichen Anwendungskonzentration von 0,9 ml/m² bereits einen solch starken Effekt aufweist. Natürlich spielen bei der Wirkung sowohl die Qualität des angewandten Neemöls als auch die Formulierung des Produkts eine wichtige Rolle. So wird zur Herstellung der beiden hochwirksamen Neemprodukte ein Neemöl verwendet, welches durch Extraktion des Samens mit überkritischem Kohlendioxid gewonnen wird [4]. Ein Vergleich mit dem 5 Jahre alten TN-MP 100 mit seiner durchaus noch beachtlichen Aktivität zeigt auch die Beständigkeit der Antimilbenwirkung über Jahre hinweg.

Das vom Hersteller als Akarizid bezeichnete Nimbasan hat diesbezüglich keine Wirkung. Interessant ist dabei, dass dieses Produkt das bei Insekten hochwirksame Azadirachtin in hoch angereicherter Dosis enthält [5]. Man kann deshalb vermuten, dass bei Spinnentieren, wie hier im Fall von *D. firinae*, Azadirachtin zwar eine synergistische, aber keine entscheidende Wirkung hat. Während die Gruppe der Azadirachtine bei den meisten Insekten bereits im ppm-Bereich abschreckend wirkt und deren Metamorphose und Fortpflanzung hemmt, ist dies bei der untersuchten Milbe trotz der hohen Dosis nicht der Fall. Detailliertere Studien werden zeigen, ob die Azadirachtine überhaupt eine und,

wenn ja, welche Wirkung bei Arachniden und hier bei Milben haben. Möglicherweise beruht die abschreckende oder fraßhemmende Wirkung des Neemöls auf anderen Stoffen aus der Gruppe der Bitterstoffe, die dort in großer Menge vorhanden sind und von denen eine Vielzahl zur chemischen Klasse der Limonoide gehört [7].

Oetzel [2] führte mit TN-MP 100 Feldversuche mit benutzten Matratzen und Polstermöbeln durch, deren Ergebnisse darauf hindeuten, dass dieses Produkt eine Tiefenwirkung hat. Bei einer Wasser abweisenden Ausrüstung der Polstermöbel blieb die Neemölformulierung an der Oberfläche adsorbiert und wurde deshalb nach kurzer Zeit mit dem Staub wieder abgesaugt. Als Konsequenz wurde bei diesen Möbeln keine deutliche Reduzierung des Allergengehalts gefunden, während alle Matratzen auch noch nach einem Jahr allergenfrei waren. Zusammen mit den vorliegenden Labordaten aus dem Langzeitversuch ergibt sich ein Wirkungsmechanismus des Neemöls, der auf einer Störung des Milbenwachstums und nicht auf einer Abtötung im Sinne eines Akarizids beruht. Es wird nun Aufgabe einer plazebokontrollierten klinischen Studie sein, die Langzeitwirkung des Neemöls und insbesondere des am besten wirksamen Produkts auf atopische Patienten zu klären.

Literatur

1. Chang JH, Becker A, Ferguson A, Manfreda J, Simons E, Chan H, Noertjojo K, Chan-Yeung M. Effect of application of benzyl benzoate on house dust mite allergen levels. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996; 77: 187-90
2. Oetzel H. Wissenswertes zur Neemölformulierung TN-MP 100. www.umweltanalytik.com, 1997
3. Platts-Mills TAE, Chapman M. Dust mites: immunology, allergic diseases, and environmental control. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80: 755-75
4. Quirin K-W, Rembold H. Extraktion von Inhaltsstoffen aus Bestandteilen des Neembauums. PCT-Anmeldung WO 97/25867, 1996
5. Rao PVS, Annadurai RS, Srinivas M. Check mite composition and a process for preparing the same. United States Patent 6,060,075, 2000
6. Rembold H. Azadirachtins: their structure and mode of action. In: Arnason JT, Philogène BJR, Morand P, eds. *Insecticides of Plant Origin*. ACS Symposium Series 387. Washington: American Chemical Society, 1989: 150-63
7. Schmutterer H, ed. *The Neem Tree and other Meliaceous Plants*. Mumbai: Neem Foundation, 2002: 893
8. Schnyder B, Schweri T, Thomann B, Pichler C. Hausstaubmilbenallergie. *Schweiz Med Wochenschr* 2000; 130: 443-7