

# Tørt øye og parasitten Demodex

Jan Richard Bruenech, Inga-Britt Kjellevoid Haugen

Institutt for optometri og synsvitenskap, Fakultet for helsevitenskap, Høgskolen i Buskerud og Vestfold, 3611 Kongsberg, Norge

Received May 21, 2014, accepted July 25, 2014

Keywords: demodex, dry eye syndrome, meibomian gland dysfunction, dry eye

Correspondence: [jan.richard.bruenech@hbo.no](mailto:jan.richard.bruenech@hbo.no)

## Abstract

Dry eye syndrome (DES) is a common condition causing dry eye sensation and ocular inflammation. The etiology is not fully explored, but clinical trials have demonstrated that the secretory functions of the eyelids can be compromised by microorganisms.

Demodex are parasites which can also infest the follicles and glands of the lids, but their adverse effect is not equally well documented. This paper presents some unique features of the parasites and their potential implication in the etiology of DES and other ocular conditions, obtained through a case study and histological analysis of eyelids from previous research. Twenty-four eyelashes were methodically extracted from the eyelids of a 51 year old male identified with DES. The histological sections and eyelashes were analysed with light microscopy. Thirty-eight parasites were identified. They had a length of 300-555  $\mu\text{m}$  and a diameter of 30-75  $\mu\text{m}$ . The histological examinations indicated that the lash follicles accommodate considerably more secretory substance (in which most parasites are embedded) than what is revealed through conventional methods of lash extraction. It is therefore legitimate to assume that a population of Demodex is arguably larger than indicated by most clinical methods. Furthermore, the tubular system inside the meibomian glands was found to have diameters that corresponded with the diameters of the parasites, which indicates that the parasites are physically capable of blocking the secretory passageways. Finally, the parasites have eight segmented, claw-shaped legs with large ranges of motion. The mechanical and immunological provocation they inflict on host tissues is arguably sufficient to cause inflammation.

This paper promotes the view that when a population of Demodex reaches a critical level it has the capacity to cause secretory dysfunctions in the eyelids and may hence be implicated in the etiology of DES and other ocular inflammatory conditions.

## Sammendrag

«Dry eye syndrome» (DES) er en hyppig forekommende tilstand som gir tørrhetsfølelse og okulær inflammasjon. Etiologien er ikke fullstendig kartlagt, men kliniske studier har vist at mikroorganismer kan bidra til å skape dysfunksjoner i øyelokkets sekretoriske system. Demodex er parasitter som også kan infisere hårfollikler og kjertler i øyelokket, men den helsemessige betydningen av disse organismene er mindre dokumentert. Kasuset presenterer unike særtrekk ved parasitten og dens potensielle evne til å være involvert i etiologien til DES og andre okulære lidelser via en kasuistikk og histologiske analyser av øyelokk fra tidligere studier. Tjuefire cilier ble metodisk epilert fra øyelokket på en 51 år gammel mann identifisert med DES. De histologiske snittene og ciliene ble analysert med lysmikroskop. Totalt 38 parasitter ble identifisert. De hadde en lengde på 300-555  $\mu\text{m}$  og diameter på 30-75  $\mu\text{m}$ . De histologiske analysene indikerte at folliklene i øyelokket inneholder vesentlig mer sekret (hvor flest parasitter oppholder

seg) enn det som fremkommer ved bruk av tradisjonelle epileringmetoder. Det er derfor naturlig å anta at populasjonen av Demodex trolig er større enn det som påvises ved bruk av de fleste kliniske metoder. Analyser av de meibomske kjertlene viste at diameteren på deres tubulære kanaler hadde tilnærmet lik diameter som parasittene, hvilket indikerer at parasittene er i stand til å fysisk blokkere kjertlenes interne transportsystem. Parasittene har åtte leddede klo-formede ben med store bevegelsesmuligheter. Deres mekaniske og immunologiske påvirkning på vertsvevet vil trolig være tilstrekkelig til å trigge inflammatoriske responser.

Det konkluderes med at når størrelsen på en populasjon av Demodex når et kritisk nivå vil den kunne skape sekretoriske dysfunksjoner i øyelokket og således forårsake tilstander som DES og et bredt spekter av andre okulære betennelsestilstander.

## Introduksjon

Tørt øye, også kjent som “keratoconjunctivitis sicca” eller “dry eye syndrome” (DES), er en tilstand som rammer store deler av befolkningen. Forekomsten øker med alderen og rammer over 1/3 av eldre individer. Antall nye tilfeller vil trolig stige i tiden fremover ettersom den forventede levealder stiger (Moss, Klein, & Klein, 2000). Etiologien er multifaktoriell og ikke fullstendig kartlagt, men endret produksjon i øyelokkets talgkjertler er ansett som en medvirkende årsak (Liu, Sheha, & Tseng, 2010). Kliniske studier har vist at sekretproduksjonen i meibomske kjertler og Zeiss kjertler kan påvirkes dersom de infiseres av mikroorganismer (Nichols et al., 2011). Dette kan medføre tidlig dehydrering av tårefilmen, inflammasjon i øyelokkranden, dysfunksjonelle cilier og øvrige symptomer som assosieres med DES (Jackson, 2008; Ohashi et al., 2003). Behandling med antibakterielle og antivirale midler fører imidlertid ikke alltid til remisjon, noe som tyder på at det også er andre organismer, og ikke bare bakterier og virus, som har evnen til å infisere og påvirke disse kjertlene.

Demodex er en type hårsykkemidd (follikelmidd) som har stor utbredelse i befolkningen, tilsynelatende uavhengig av geografi, etnisitet og kjønn (Lacey, Kavanagh, & Tseng, 2009; Vargas-Arzola et al., 2012; Rather & Hassan, 2014; Rusiecka-Ziółkowska, Nokiell, & Fleischer, 2014). Forekomsten ser ut til å være lav blant yngre individer, men øker kraftig med alderen og affiserer trolig majoriteten av alle individer over 50 år (Tabell 1).

Tabell 1: Forekomst av parasitten Demodex i forhold til ulike aldersgrupper.

Aldersgruppe (år)	Forekomst (%)
3–15	13
19–25	34
31–50	69
51–70	87
70–96	95

Note: Tabellen kombinerer resultater fra flere studier (Liu et al., 2010; Isa et al., 2011; Vargas-Arzola et al., 2012).

Demodex har fått sitt navn på grunn av sin forkjærlighet for talg og sin mark-lignende form (demo-fett, dex-mark). Det antas at middene også livnærer seg av hudceller og de blir derfor ofte omtalt som parasitter. Selv om nyere studier har identifisert flere fenotyper, er det registrert kun to hovedarter av denne parasitten på mennesket (Hu, Zhao, Cheng & Ma, 2014). Begge er påvist i tett kontakt med de fleste typer kroppshår, men de viser en klar preferanse for ansiktshår, særlig øyevipper og øyebryn. Demodex folliculorum lever i selve hårfollikkelen, mens den litt

mindre varianten *Demodex brevis* lever i tilstøtende talgkjertler (Liu et al., 2010). Parasittene har en livssyklus på ca. 2 til 3 uker. Utviklingen fra egg til små larver skjer allerede i løpet av de første dagene, og flere larver kan klekkes ut i en og samme hårfollikkel. Etter larvestadiet får de gradvis en mer avlang kroppsforn og utvikler et fjerde sett med ben. Som fullmodne parasitter når de en lengde på opp til 0,4 mm (Isa et al., 2011). Om natten kommer de ut på hudoverflaten for å formere seg og kan da også forflytte seg fra en follikkel til en annen.

Middene bærer med seg mikroorganismer på sin kroppsoverflate, så vel som innvendig (Lacey, Delaney, Kavanagh & Powell, 2007). Denne form for assistert transport av bakterier (primært stafylokokker, streptokokker og basiller) har blitt satt i sammenheng med flere typer dermatologiske lidelser (Li et al., 2010; Bevins & Liu, 2007). De fleste *Demodex folliculorum* og *Demodex brevis* dør mens de oppholder seg i henholdsvis folliklene og talgkjertlene. Når middene går i oppløsning frigjøres mikroorganismer og avfallsstoffer som har blitt lagret gjennom livsløpet (Lacey et al., 2007). Under normale omstendigheter gir ikke dette opphav til symptomer, noe som har ført til at *Demodex* ofte omtales som en veltilpasset parasitt. Den viser imidlertid klare opportunistiske tendenser og populasjonen kan øke kraftig dersom livsvilkårene blir gunstige, som for eksempel når vertsorganismens immunforsvar nedsettes eller den generelle helsetilstanden reduseres. Plager som tørrhet, kløe, irritasjon og rødhet kan da forekomme. Tilstanden betegnes da som demodikose, men forveksles ofte med bakteriell blefaritt, konjunktivitt eller andre okulære lidelser som gir lignende symptomer og kjennetegn (Lee, Chun, Kim, Kim, & Kim, 2010; Koo et al., 2012).

Kartlegging av *Demodex* utføres som regel ikke i forbindelse med rutinemessige synsundersøkelser og de metodene som benyttes er heller ikke entydige eller standardiserte. Det kan derfor ikke utelukkes at prevalensen til demodikose er undervurdert og at parasitten er involvert i flere okulære lidelser enn tidligere antatt (Liu et al., 2010; Gao, Di Pascuale, Elizondo, & Tseng, 2007; O'Reilly et al., 2012). Likeledes eksisterer det ingen konsensus i litteraturen når det gjelder behandling av demodikose. Det oppnås ikke alltid remisjon ved bruk av antiparasitt-medikamenter og en rekke studier promoterer derfor bruk av alkohol, povidone-iodine, tetreolje eller andre preparater med antatt antiseptiske egenskaper (Lacey et al., 2009). Den nødvendige konsentrasjonen av disse medikamentene for å redusere størrelsen på kolonien er imidlertid fortsatt uavklart. Dette på tross av at parasittens eksistens har vært kjent i mange år (Simon, 1842).

Biomedisinsk forskningsenhet ved Fakultet for helsevitenskap, Høgskolen i Buskerud og Vestfold, har siden 2011 arbeidet med tematikken *Demodex*. Det er lagt spesiell fokus på parasittens morfologi og fysiologiske egenskaper, samt de potensielle histologiske endringer disse kan forårsake og de okulære lidelser som kan oppstå. Parasittens livs- og vekstvilkår, samt resistens overfor utvalgte antiseptiske preparater, blir også evaluert.

Dette kasuset bidrar til å belyse problemstillingen rundt *Demodex*, og som synliggjør enkelte sider av parasittens særtrekk. Parasittene ble observert *in vivo* med spaltelampe og lysmikroskopi. Histologiske observasjoner av øyelokket er inkludert for å vurdere mulige områder som parasitten kan infisere og påvirke.

## Materialer og metoder

### Histologiske analyser

Transversale snitt av øvre øyelokk fra fire donorer (50, 56, 61 og 70 år) ble analysert. Snittene ble hentet fra tidligere histologiske forskningsprosjekter, utført i samsvar med

Helsinki konvensjonen. De hadde en tykkelse på 0,75µm og

var preparert for lysmikroskopering ved hjelp av standard histokjemiske metoder.

Snittene var tatt fra midtre del av øyelokket og inneholdt meibomske kjertler, follikler og cilier med en longitudinal orientering. Disse ble målt og registrert ved hjelp av mikroskopets analyseprogram (beskrevet nedenfor). Tilsvarende analyser ble foretatt av parasittene. De numeriske verdiene ble benyttet til å vurdere parasittenes evne til å infiltrere og påvirke øyelokkets sekretoriske systemer. Aldersrelaterte vevsendringer og andre faktorer som kunne ha betydning for parasittenes vekst og livsvilkår ble også dokumentert.

### Kliniske prosedyrer

Kasuistikken presenterer en 51 år gammel mann med subjektive plager relatert til tørre øyne. Han har tidligere hatt tilfeller av blefaritt, uten remisjon etter gjentatte behandlinger med bredspektret antibiotika. Det ble utført anamnese med fokus på okulært ubehag, allergi, revmatisme, okulære lidelser, medikamentbruk og generell helsetilstand. En fullverdig synsundersøkelse ble fortatt for evaluering av synsfunksjon. Basert på pasientens numeriske alder, historikk og symptomer ble han også undersøkt i forhold til en eventuell *Demodex* infestasjon.

Det ble epilert totalt 24 cilier, 12 fra hvert øye (åtte fra øvre øyelokk og fire fra nedre). Epileringen ble utført med egnet pinsett. Hvert hårstrå ble lett manipulert før utdraging i forsøk på å frigjøre hårrot og tilstøtende sekret fra veggen i follikkelen. De ble deretter trukket langsomt ut med en trekktrening som sammenfalt med vekstretningen av hvert enkelt hårstrå. Denne metoden ble primært benyttet for å få mest mulig sekret ut sammen med hårroten, men også for å hindre brekkasje slik at alle cilier kunne inspiseres i fulle lengder. Observasjon av sekretoriske kjertler og tilstøtende strukturer i øyets fremre segment ble foretatt med en Haag-Streit spaltelampe med LED belysning. Inflammatoriske tilstander, vevsendringer og andre tegn på infestasjon ble dokumentert ved hjelp av en integrert avbildningsenhet, EyeSuite IM900. Det ble gitt skriftlig konsensus fra pasienten på at all dokumentasjon kunne publiseres.

### Observasjoner av cilier

Samtlige epilerte cilier ble lagt på individuelle objektglass og tilført like mengder fysiologisk saltvann. Dekkglass ble benyttet for å øke lystransmisjonen gjennom preparatet og samtidig muliggjøre bruk av oljeobjektiv med høy forstørrelse. Enkelte av preparatene (cilier) som inneholdt *Demodex* ble eksponert for væsker med antiseptiske egenskaper for å observere parasittens overlevelsessevne. Ni preparater fikk tilført alkohol med ulike konsentrasjoner (5%, 50% og 100%), mens ni andre preparater ble eksponert for Tea-Tree Oil (TTO)/Oleum melaleucae (2%, 50% og 100%). De laveste konsentrasjonene ble valgt for å mimikere den tilnærmede konsentrasjon som ofte benyttes i kommersielle rensesubstanter for hud og hår.

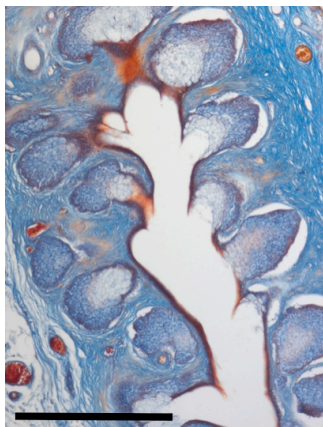
Et utvalg parasitter ble isolert fra preparatene og benyttet som kontrollgruppe, kun tilført fysiologisk saltvann. Det ble også gjort forsøk med kontrastfremmende væsker (metylenblått og fluorescein) på noen utvalgte preparater. Samtlige væsker ble tilført med separate pipetter for å unngå uønskede kjemiske reaksjoner. Preparatene ble studert gjennom et lysmikroskop (Zeiss axio lab1med LED lys) med observasjonsmuligheter for faseforskyvning og fluorescein. Bilder av preparatene ble overført elektronisk via et digitalt kamera (ProgRes C5) til et billedbehandlingssystem (Bitplane Imaris) med analysemuligheter og multifokus. Analysesystemet registrerte alle numeriske verdier i tilknytning til cilier, parasitter og histologiske strukturer. Systemet dokumenterte også alle endringer som inntraff over tid og enkelte parasitter ble filmet uavbrutt i opp til 8 timer.

## Resultater

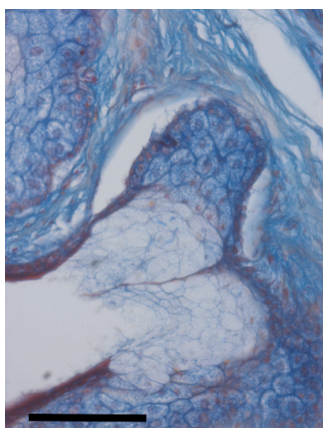
### Histologiske analyser

Alle observerte meibomske kjertler hadde samme grunnleggende organisering, med en sentral kanal som strakte seg fra tarsalplatens øvre del og ned til utførselsgangen på øyelokkkranden (Figur 1). Kanalveggene var kledd med flerlaget epitel som økte i tykkelse mot åpningen ved øyelokkkranden. Den indre diameteren varierte langs de respektive kanalenes forløp (170–280  $\mu\text{m}$ ), hvorav de smaleste kanalene ble observert i vevet fra den eldste donoren. Sistnevnte preparat hadde også høyest andel keratin ved utførselsgangen.

Velavgrensede, sekkformede celleansamlinger (sakkulære enheter) kunne observeres langs hele lengden av kanalene. Enhetene varierte i diameter, fra 70 til 200  $\mu\text{m}$ , avhengig av hvor mange talgproduserende celler de inneholdt. Cellene i periferien av enhetene hadde markerte cellevegger og velavgrensede kjerner, noe som stod i stor kontrast til cellene som hadde migrert mot enhetenes utgang. Her var veggen til de sekretoriske cellene tilnærmet oppløst og deres sekret, meibom, fremstod som en lys homogen masse (Figur 2). Små kanaler dannet forbindelse mellom den enkelte sekretoriske enhet og hovedkanalen. Disse hadde diameterer som varierte fra 30 til 120  $\mu\text{m}$ , og var tilsynelatende proporsjonale med størrelsen på den sakkulære enheten de fraktet sekret fra.



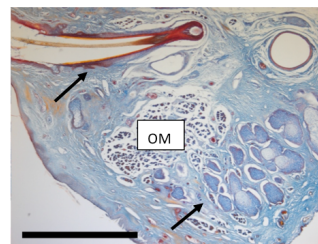
Figur 1: Mikrografiet viser den sentrale kanalen i en meibomsk kjertel med en rekke sakkulære sekretoriske enheter langs det vertikale forløpet. Markørens lengde er 500  $\mu\text{m}$ .



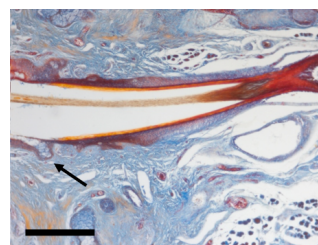
Figur 2: Mikrografiet viser de sekretoriske cellene i en av de sakkulære enhetene. Enhetens perifere celler har intakte membraner, mens de migrerte cellene var tilnærmet oppløst og dannet en homogen masse av sekret. Markørens lengde er 100  $\mu\text{m}$ .

Cilieni og deres follikler hadde en akseretning som divergerte noe i forhold til de meibomske kjertlene (Figur 3). Hårfolliklene besto av en flerlaget epitelvegg som tett omsluttet ciliens hårrot i bunnen av follikkelen. Avstanden mellom veggene økte

progressivt helt ut til åpningen på øyelokkkranden. Diameteren på åpningen (2–2,5 mm fra hårroten), målte opp til 300  $\mu\text{m}$  i de største folliklene. Langs epitelveggen, mellom hårroten og øyelokkkranden, kunne det observeres en til to sekkformede talgkjertler som munnet ut i follikkelen (Figur 4). Deres plassering og morfologi samsvarte med litteraturens beskrivelser av Zeiss kjertler.



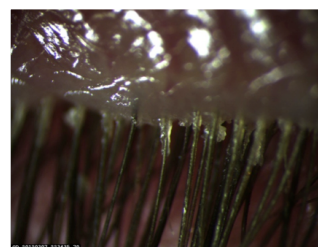
Figur 3: Mikrografiet viser øyelokkkranden med en follikkel og dens cilie (markert med pil øverst i bildet). De sekretoriske enhetene til en meibomsk kjertel ligger langs med den bulbære delen av øyelokket (markert med pil nederst i bildet). Orbikularis muskelen (m. orbicularis oculi) kan sees mellom follikkelen og den meibomske kjertelen (merket OM). Markørens lengde er 1000  $\mu\text{m}$ .



Figur 4: Mikrografiet viser en av de sekretoriske kjertlene (Zeiss kjertler) der den munner ut i follikkelen (markert med pil). Markørens lengde er 300  $\mu\text{m}$ .

### Kliniske observasjoner

Inspeksjon med spaltelampe viste at majoriteten av cilieni til pasienten var omgitt av en gulaktig substans. Konsentrasjonen var størst ved øyelokkkranden og noen få millimeter utover cilieni (Figur 5). Inntørkede og avflassede fragmenter av det samme belegget kunne også observeres lengre ut på cilieni. Beleggets konsistens, farge og utforming samsvarte med observasjoner fra tidligere studier hvor det omtales som en kolarett eller "cylindrical dandruff" (Gao et al., 2005). Flere av cilieni hadde divergerende akseretninger og krysset over nabocilier. Noen var også brukket eller manglet den naturlige koniske avslutning. Enkelte av utførselsgangene til de meibomske kjertlene var noe elevert og sekretet hadde høy viskositet. Andre utførselsganger var tilsynelatende tilstoppet og bar preg av MGD ("meibomian gland dysfunction"). Både øvre og nedre øyelokk hadde betydelig grad av inflammasjon (Figur 6).



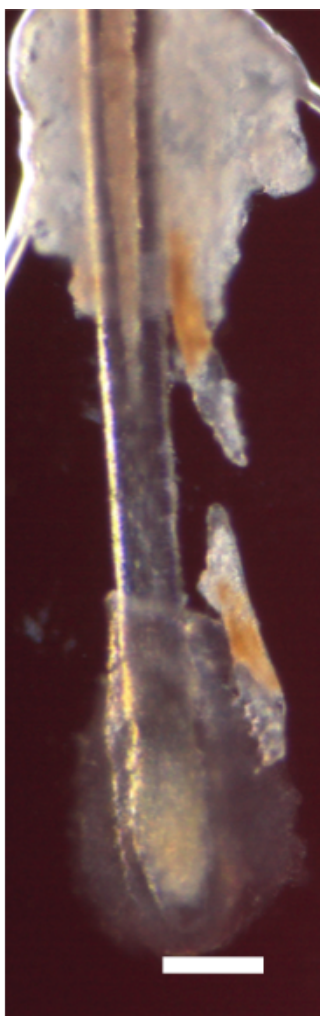
Figur 5: Bildet (tatt gjennom spaltelampemikroskop) viser cilier med «cylindrical dandruff».



Figur 6: Bildet viser inflammasjon i øyelokkranden assosiert med *Demodex* infestasjon. Bildet er tatt gjennom spaltelampemikroskop med lav forstørrelse.

#### Observasjoner av cilier og parasitter

Pasientens cilier varierte i tykkelse langs hele sin lengde. Majoriteten hadde en diameter på 60–70  $\mu\text{m}$  rett etter hårroten. Tykkelsen økte så gradvis til 100–150  $\mu\text{m}$ , for deretter å avta igjen mot cilienes ende.



Figur 7: Mikrografiet viser flere eksemplarer av parasitten *Demodex folliculorum* liggende parallelt med cilienes lengderetning. Kroppen til parasitten fremstår som transparent, men får en høyere kontrast mot omgivelsene når den absorberer fargestoff, i dette tilfelle fluorescein. Markørens lengde er 100  $\mu\text{m}$ .

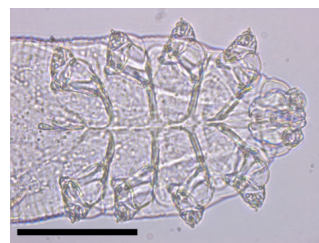
Det ble observert 38 eksemplarer av parasitten *Demodex folliculorum* i tilknytning til de 24 epilerte ciliene. Forekomsten var tilnærmet lik i høyre (20) og venstre øyet (18). Kun seks av øyevippene var uten parasitter, mens det ble funnet ett til fem eksemplarer blant de øvrige. Parasitter ble observert langs hele hårrotens lengde, med kroppen plassert parallelt med hårets lengderetning og halen pekende mot follikkelmunningen (Figur 7 og 8). Enkelte parasitter lå plassert så langt fra hårroten

at halepartiet trolig utgjorde en del av den sylindriske avleiringen («cylindrical dandruff») på øyelokkranden.



Figur 8: Mikrografiet viser *Demodex folliculorum* med hodet vendt ned mot bunnen av follikkelen. De fleste av de karakteristiske bena er synlige. Markørens lengde er 200  $\mu\text{m}$ .

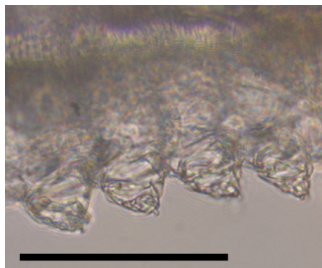
*Demodex*'s kropp var avlang og varierte i lengde fra 300–555  $\mu\text{m}$ , med en tykkelse på 30–75  $\mu\text{m}$ . Den var delt inn i to hoveddeler som klart skilte seg fra hverandre i utseende og funksjon. Hode, bryst og ben var sammenføyet i et velavgrænset område som utgjorde ca. 1/3 av parasittens totale lengde. Dette området hadde klare likhetstrekk med det som omtales som cephalothorax hos andre leddyr/artropoder (Jing, Shulin, & Ying, 2005). Hodet, som utgjorde et mindre fremspring av forkroppen, hadde et komplekst munnparti bestående av flere deler. Sentralt hadde den en lang, konisk og spiss struktur som lignet den typen spiseredskap (hypostom) som finnes i munnpartiet hos andre midd og slektsnære arter (acari). Denne var igjen omgitt av et par korte, kraftige og flerleddede utstikkere. Disse kunne beveges fremover og lateralt, både synkront og uavhengig av hverandre. Det siste leddet, som også var bevegelig i forhold til de øvrige leddene, hadde en klo-lignende struktur. Dette leddet hadde en mer bakover rettet orientering, vinklet innover og under buken. Denne organiseringen hadde store likhetstrekk med det som beskrives som munnekstremiteter (palper og chelicerer) hos andre artropoder (Figur 9). Majoriteten av parasittene hadde åtte korte ben, mens kun et fåtall hadde seks. Raden av ben hadde lik innbyrdes avstand og var plassert symmetrisk på hver side av kroppen. Hvert ben bestod av flere ledd, hvorav det siste leddet endte i spisse klo-formede strukturer (Figur 10). Benene kunne bevege seg individuelt og uavhengig av hverandre, så vel som i synkroniserte padlebevegelser.



Figur 9: Bildet viser parasitten fra undersiden (buken). Det siste leddet på hvert av de åtte bena ender i spisse koniske strukturer. Plasseringen av reproduksjonssystemet (mellom og noe nedenfor de bakerste bena) indikerer at denne parasitten er hunnkjønn. Markørens lengde er 50  $\mu\text{m}$ .

Parasittene var kledd av noe som fremstod som et segmentert hudskjelett (eksoskjelett). Dette var strukturert ulikt på de ulike delene av kroppen. Buksiden av cephalothorax bestod av flere plater som var smeltet sammen sentralt i par (Figur 9). Ben-

parene hadde sitt utspring fra hvert sitt platesett. Platesettene fremsto som panserformet og lite bevegelige. Dorsalsiden (ryggsiden) av cephalothorax var mindre segmentert og eksoskjelettet hadde her en regelmessig bølgeformet overflate.



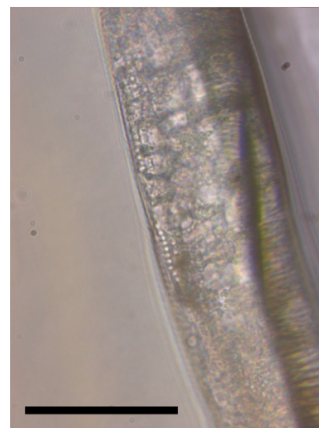
Figur 10: Bildet viser parasittens korte leddformede ben sett fra siden. Markørens lengde er 50  $\mu\text{m}$ .

Den resterende lengden (2/3) av parasitten hadde en enkel sylindrisk form med en konisk avslutning. Denne bakre delen av midten hadde likhetstrekk med det som beskrives som opisthosoma hos andre artropoder. Det var ingen utstikkere fra denne delen. Den avlange kroppen var semi-transparent og ansamlinger av sirkulære strukturer kunne observeres i grupper (Figur 11) eller i lange rekker når den ble gjennomlyst (Figur 12). Den ytterste koniske haleregionen virket imidlertid relativt kompakt. Hele eksoskjelettet til denne delen av parasitten hadde det samme bølgeformede utseende som ble observert på dorsalsiden av cephalothorax. Her virket imidlertid segmentene mer bevegelige i forhold til hverandre (Figur 12 og 14).



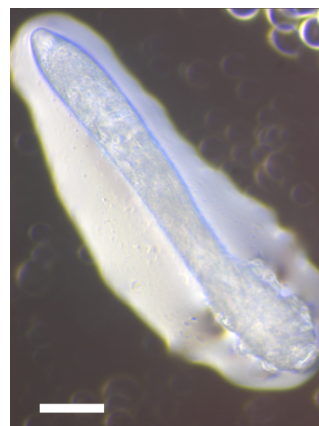
Figur 11: Mikrografiet viser parasitten fra undersiden med hodepartiet og de leddformede bena pekende nedover på bildet. Den gjennomlyste kroppsdelen med halepartiet er semi-transparent og viser ansamlinger av sirkulære strukturer. Denne kroppsdelen (opisthosoma) er bevegelig i ulike retninger. Markørens lengde er 100  $\mu\text{m}$ .

De fleste parasittene lå stille så lenge de var omgitt av sekret og belysningen i mikroskopet var moderat. Ved høyere lysintensitet eller mer direkte lyseksposering ble bevegelsesmønstrene tydeligere. Alle bevegelser ble diktret av de åtte bena og når parasitten endret retning oppstod det en vinkel mellom frontpartiet og det mer passive kroppspartiet. Vinkelen kunne dannes i overgangen mellom de to kroppsdelen, så vel som langs hele opisthosomas forløp (Figur 11). Munnbenene var også aktive under bevegelse, og bidro, om enn i noe mindre grad, til fremdriften. Hastigheten på parasittens bevegelser langs objektglasset ble stipulert til å være 10–20 mm i timen.



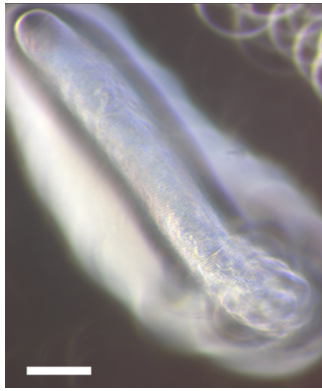
Figur 12: Mikrografiet viser en gjennomlysning av parasitten hvor konturene av indre strukturer er synlige. Her danner sirkulære strukturer rekker. Til høyre i bildet kan eksoskjelettets bølgeformede overflate skimtes. Markørens lengde er 50  $\mu\text{m}$ .

Mikroskopets multifokus gjorde det mulig å observere benas bevegelsesmønster mer inngående (Figur 13). Deres flerleddede organisering favoriserte en fremover rettet bevegelse. Evnen til å bevege bena i dorsal retning var imidlertid begrenset. Denne begrensningen, samt benas korte rekkevidde i forhold til parasittens totale diameter, gjorde at parasitter som lå på ryggen ikke klarte å forflytte seg. Ved bruk av multifokus ble også den bølgede overflaten på parasittens eksoskjelett mer tydelig (Figur 14). Dette gjorde det mulig å differensiere mellom de ulike typene av parasitter med større sikkerhet, da *Demodex brevis* mangler bølgemønsteret på fremre dorsale overflate (Ding, Li, & Wang, 1992).



Figur 13: Mikrografiet har fokus i plan med parasittens buk og viser konturene av de korte leddformede bena som springer ut fra buksiden. Markørens lengde er 50  $\mu\text{m}$ .

I fysiologisk saltvann og moderat belysning fra mikroskopet hadde majoriteten av parasittene en levetid på 4–5 timer på objektglasset. I tillegg til bevegelsene av ben og kjeveparti, kunne de levende parasittene skilles fra de døde ved at de sistnevnte fremstod som dehydrerte og mer utstrakt i sin form. Lave konsentrasjoner av alkohol hadde tilsynelatende liten effekt på levetiden, men når parasittene ble tilført en 100% løsning ble tiden redusert ned til 6–20 minutter. En konsentrasjon av 2% TTO ga minimal reduksjon i overlevelsestid, men den økte viskositeten (i forhold til fysiologisk saltvann) virket noe hemmende på parasittens bevegelser. I 100% TTO ble overlevelsestiden redusert til 5–15 minutter. Basert på størrelse og form ble samtlige parasitter identifisert som *Demodex folliculorum*, ingen av typen *Demodex brevis*.



Figur 14: Mikrografiet har fokus på parasittens rygg og viser den bølgeformede overflaten til eksoskjelettet til en *Demodex folliculorum*. Avbildningen med multifokus indikerer middens bevegelse av cephalothorax i forhold til opisthosoma. Markørens lengde er 50  $\mu\text{m}$ .

Etter at parasitter ble påvist på majoriteten av cilie som ble epilert, ble pasienten anbefalt å supplere daglig rengjøring av hud og ansikt med våtservietter fra en av de markedsledende kosmetikkprodusenter (med 0,5–2% innhold av TTO). Han ble deretter oppfordret til ny etterkontroll og epilering. Etter 3 uker med daglig rengjøring av øyelokkene (etter anbefalt prosedyre) var forekomsten av *Demodex*, inflammasjonen, tegn på MGD og DES redusert. Det ble fortsatt observert avfallsstoffer rundt basen av cilie ("cylindrical dandruff"), men i mindre grad enn tidligere.

### Diskusjon

*Demodex folliculorum* ble identifisert allerede for 170 år siden i forbindelse med et klinisk tilfelle som hadde store likhetstrekk med det som beskrives i dette kasuset. Felles for disse studiene er at de påviser store kolonier av *Demodex* i forbindelse med inflammatoriske lidelser i palpebrale og konjunktivale strukturer.

De histologiske analysene av øyelokk fra donorvev, som ble foretatt i dette studiet, samt observasjoner av parasittens morfologi og fysiologiske egenskaper gir grunnlag til å argumentere for at *Demodex* har de nødvendige biomekaniske forutsetninger til å kunne skape de sekretoriske dysfunksjoner som assosieres med MGD og DES. Disse forutsetningene, spredningsevne og potensielle behandlingsformer vil bli diskutert suksessivt.

#### *Evne til å skape dysfunksjoner i øyelokkets pilosebakøse enheter.*

I litteraturen hevdes det at *Demodex* ikke utgjør noe problem så lenge størrelsen på kolonien er moderat. Telling av parasitter i etterkant av epilering gir imidlertid ikke et fullverdig bilde av hvor stor infestasjonen er eller hvor kraftig øyelokkets cilie- og kjertelsystem er blitt påvirket. Majoriteten av de identifiserte 38 parasittene befant seg i sekretet som omsluttet de epilerte cilie. Beregninger utført med mikroskopets analyseprogram viste at mengden sekret som ble trukket ut med cilie kun utgjorde en liten del av det sekretet som normalt fyller hulrommet i follikkelene (basert på målinger av de histologiske snittene). Det er derfor naturlig å tro at det som regel vil være flere gjenværende parasitter også dypt nede i follikkelen etter epilering. Sekretet som frigjøres sammen med cilien er i tillegg relativt opakt og vil også kunne kamuflere mange av de semi-transparente parasittene. Tidligere studier, hvor det ikke har blitt benyttet kontrastfremmende preparater, eller hvor observasjonsperioden under mikroskopet har vært for kortvarig til at parasittene har hatt tid til å migrere ut av sekretet, har trolig bidratt til en underrapportering av koloniens reelle størrelse. Videre er det naturlig å tro at det kun er de parasittene som op-

holder seg i follikkelene (*Demodex folliculorum*) som blir trukket ut sammen med cilie, og at de som ligger dypt begravet i de tilstøtende sekretoriske kjertlene blir værende igjen (*Demodex brevis*). Det er de sistnevnte parasittene som har størst evne til å påvirke øyelokkets ulike kjertler (Zeiss og meibomske kjertler).

De histologiske analysene av øyelokkets kjertler synes å bekrefte denne hypotesen. I de meibomske kjertlene produseres sekretet i runde sakkulære enheter og fraktes via små tubulære kanaler ut til en stor felles vertikal hovedkanal. De histologiske analysene viste at disse små transportkanalene hadde diametere på til 30–120  $\mu\text{m}$ , mens den gjennomsnittlige diameteren på parasittene i dette studiet var 30–75  $\mu\text{m}$ . Dette tilsier at selv *Demodex folliculorum*, som ennå ikke er påvist i disse kjertlene, har fysisk mulighet til å nå inn til de innerste sekretoriske cellene og blokkere majoriteten av kanalene med sine legemer. *Demodex brevis*, som er mindre i diameter og lengde, vil derfor ha muligheten til å infiltrere enda dypere inn i disse kjertlene. Det er naturlig å anta at produksjonen og transporten av triglyserider og frie fettsyrer fra de sekretoriske cellene kun vil fungere tilfredsstillende så lenge størrelsen på koloniene ikke overstiger et visst kritisk nivå. Vokser kolonien utover dette nivået vil det påvirke sekretets produksjon, antiinflammatoriske egenskaper, og evne til å hindre fordampning av tårefilmen, med påfølgende kliniske manifestasjoner.

En tilsvarende blokkering vil kunne skje i de mindre Zeiss kjertlene som sitter tilknyttet cilie. Dette vil kunne nedsette tilgangen på fuktighet, vitaminer og andre næringsstoffer som cilie trenger for å opprettholde sin struktur og fleksibilitet. I dette kasuset ble parasittene påvist i sekretet langs hele cilienes lengde, også i tilknytning til selve roten. Dette viser at *Demodex folliculorum* har evnen til å infisere hele follikkelen og ikke bare ned til nivå med Zeiss kjertlene, slik det hevdes i enkelte sentrale studier. At de i dette tilfellet også ble påvist rundt hårroten kan bidra til å forklare hvorfor cilie forskyves, eller lettere mister sitt feste og faller ut av follikkelen hos pasienter med demodikose.

De nevnte observasjoner står i samsvar med de kliniske observasjonene av pasienten, hvor det ble konstatert inflammasjon i øyelokket, kort break up time av tårefilmen, samt trichiasis, madarosis og andre tegn på dysfungerende cilier.

Basert på denne sammenstillingen er det derfor legitimt å hevde at diagnosen demodikose ikke kan utelukkes selv om det registrerte antall parasitter er lavt.

Videre kan størrelsen på de individuelle parasittene i kolonien også være en utløsende faktor. I dette studiet ble det påvist lengre og bredere parasitter enn det som er dokumentert i tidligere studier hvor man kun har benyttet asymptomatiske forsøkspersoner.

#### *Evne til å initiere inflammatoriske reaksjoner*

*Demodex* hører inn under gruppen arachnoider og har med sine åtte leddformede ben klare likhetstrekk med sin biologiske slektning edderkopp. De spissformede strukturene på det siste leddet gir godt feste i underlaget og store bevegelsesmuligheter. Dersom parasittene har tilnærmet samme bevegelsesmønster i sitt habituelle miljø (som det de demonstrerte på objektglasset), vil den mekanisk påvirkning på cellene i follikkelene og kjertlene være betydelig. En ytterligere påvirkning vil trolig også oppstå i forbindelse med parasittens spisevaner. Det komplekse munnpartiet hadde kraftige og spissformede ekstremiteter, med klare likhetstrekk med de redskapene som andre arachnoider benytter til å knuse og partere sitt bytte. I litteraturen omtales *Demodex* ofte som en saprofytt, noe som tilsier at den kun livnærer seg på sekretet og døde celler. Det kan imidlertid ikke utelukkes at *Demodex* også destruerer, fortærer, eller på annet vis påvirker funksjonsdyktige celler. Uavhengig av om munnbena består de øvrige bena i sin destruksjon av

celler, så vil den samlede mekaniske påvirkning kunne resultere i økt avskalling av det follikulære epitelet, en prosess som er kjent for å initiere både hyperplasi, hyperkeratinisering og obstruksjon av talgkjertler, og ofte er assosiert med inflammasjon. Dersom disse cellulære reaksjonene bidrar til dannelsen av de sylindriske avfallsstoffene som bygger seg opp rundt basen av ciliene, kan "cylindrical dandruff" anses som patognomisk for demodikose og utgjør dermed en god markør for når behandling bør iverksettes.

Inflammasjon kan også fremprovoseres på immunologisk grunnlag. I motsetning til husmidten frigjør ikke Demodex sine avfallsstoffer direkte, men lagrer dem innvendig gjennom hele sitt livsløp. Dette samsvarer med observasjonene av parasittens haleparti som tilsynelatende mangler endetarm. Når disse parasittene dør og det ytre hudskjelettet går i oppløsning vil det frigjøres store mengder mikroorganismer sammen med tarminnhold og andre avfallsprodukter. Disse kan fungere som kraftige allergener og trigge immunologiske reaksjoner når vevets toleranse ovenfor stoffene overskrides. I tillegg til de immunreaksjoner som initieres umiddelbart (IgE basert hypersensitivitet) kan det ikke utelukkes at noen allergener også kan trigge en forsinket hypersensitivitetsreaksjon.

#### *Evne til infestasjon hos eldre individer*

I dette studiet ble det observert aldersrelaterte histologiske endringer og forsnevninger både i de tubulære kanalene og utførselsgangene til de meibomske kjertlene. Dette bidrar muligens til at de lettere blokkeres ved Demodex infestasjon og kan være en medvirkende årsak til at forekomsten av DES øker med alderen. De sekretoriske cellene, som ble observert i sine ulike stadier av modenhet, indikerte at meibom dannes ved holokrin produksjon (sekretet dannes ved at cellene går i oppløsning). Celle konsentrasjonen var tilsynelatende lavest hos den eldste donoren, noe som indikerer at de meibomske kjertlene har den samme aldersrelatert reduksjonen i talgproduksjon som kroppens øvrige talgkjertler. Man kan da forvente en gradvis reduksjon etter puberteten, hvor den androgenstimulerte talgproduksjon er på sitt høyeste. Dette studiet støtter således ikke tidligere hypoteser hvor det hevdes at insidensen av Demodex øker med numerisk alder fordi sekretproduksjonen i øyelokkets talgkjertler øker. Det kan likevel ikke utelukkes at aldersrelaterte endringer i sekretets viskositet og sammensetning kan øke næringsverdiene for parasitten. Det kan heller ikke utelukkes at middens evne til å destruere levende celler øker med grad av cellulær degenerasjon hos vertsorganismen. Dette ville i tilfelle forklare hvorfor Demodex fungerer som en veltilpasset saprofytt i unge vertsorganismer, mens den hos eldre individer fungerer som en mer aktiv parasitt med påfølgende hyperplasi, hyperkeratinisering og obstruksjon av talgkjertler. Likeledes kan endringer i normalfloraen med alderen muligens påvirke parasittens koeksistens med ulike bakterier.

#### *Spredningsevne*

Når parasittene ble fjernet fra vertsorganismen og isolert fra sekretet de lå i, dehydrerte de relativt raskt. I fysiologisk saltvann overlevde de imidlertid i opp til 6 timer. At overlevelsestiden var lengre enn det som er dokumentert i mange tidligere studier skyldes trolig at det ble benyttet LEDlys i mikroskopet, noe som begrenset varmeeksponeringen på de temperatursensitive og lysskye parasittene. Den lange overlevelsestiden indikerer at Demodex trolig kan overføres indirekte via felles bruk av kosmetiske produkter, sengetøy, håndklær og lignende. At man blir eksponert for parasitten er likevel ikke ensbetydende med at den overføres. Forekomsten hos småbarn er påvist å være veldig lav i forhold til alle de som, statistisk sett, har blitt eksponert for parasitten via infiserte talgkjertler på mors bryst gjennom die-perioden. Smittetidspunktet vil i tillegg være vanskelig å fastslå ettersom majoriteten av alle in-

divider forblir symptomfrie i lang tid uten påviselige okulære implikasjoner. Parasittens preferanse for øyelokkets follikler og kjertler er trolig knyttet opp mot den gode tilgangen på talg og fuktighet. Hormonproduksjon, temperatur, klimatiske forhold og øvrige faktorer som kan påvirke sekretorisk aktivitet vil derfor trolig være av betydning for parasittens vekstforhold og spredningsevne, selv om dette ikke har blitt entydig dokumentert i litteraturen. Dette tilsier at det fortsatt er behov for mer forskning på området. Beslektede varianter av parasitten finnes på et bredt spekter av andre pattedyr, men det er lite støtte i litteraturen for at det skjer noen utbredt smitteoverføring mellom dyr og mennesker.

#### *Behandling*

En stor forekomst av Demodex kan indikere nedsatt almentilstand. Underliggende patologi bør derfor utelukkes før øvrige tiltak iverksettes. Hypersensitivitet, revmatisme, endokrine lidelser og andre tilstander som kan trigge inflammasjon og påvirke sekretorisk aktivitet bør også kartlegges. Likeledes bør autonome funksjoner og medikamentbruk som påvirker disse inngå i de differensialdiagnostiske overveielser. Endret frigjøring av transmittersubstans fra postganglionære parasympatiske fibre vil eksempelvis påvirke sekresjonen i de meibomske kjertlene, mens endringer i frigjøring fra postganglionære sympatiske fibre vil påvirke vasomotorikken. I tillegg til endret blodgjennomstrømming vil kontraksjon og tonus i orbicularis oculi også kunne påvirke de sekretoriske funksjonene. Lysnivå, refraktiv status og andre parametere som påvirker den palpebrale aperture vil dermed også kunne ha implikasjoner for koloniens livsvilkår.

Det har kommet en rekke produkter på markedet til rensing av hud, hår og øyelokk. De antiseptiske ingrediensene i disse produktene er ofte alkohol og TTO, noe som hevdes å ha en effekt på Demodex. I dette studiet måtte konsentrasjonen av disse stoffene være meget høy for å påvirke levetiden til parasittene, og vesentlig høyere enn det som vanligvis benyttes i de fleste kommersielle produkter. Det kan imidlertid ikke utelukkes at produktene har en langtidseffekt som ikke kunne påvises i dette forsøket. TTO virket eksempelvis hemmende på parasittens bevegelser noe som vil kunne redusere reproduksjonsevnen og utbredelsen av kolonien. Videre vil trolig fjerning av avfallsstoffer og regelmessig rengjøring med antiseptiske stoffer påvirke parasittens interne habituelle miljø og livsvilkår. Dette er også trolig årsaken til at det i litteraturen er en viss konsensus om at god okulær hygiene, med regelmessig rengjøring av øyelokkene, kan bidra til å holde bestanden nede på et asymptotisk nivå. At pasienten i dette kaset ble tilnærmet asymptotisk etter tre uker med daglig okulær hygiene med antiseptiske preparater, underbygger dette synet.

#### **Feilkilder**

I diskusjonen ovenfor postuleres det at Demodex kan ha vært årsaken til de dysfunksjonene som ble observert hos pasienten. Dette gjelder både de som var relatert til ciliene så vel som de relatert til kjertlene. Dette forutsetter at den ene arten av parasitten (*D. folliculorum*) sameksisterer med den andre arten (*D. brevis*), noe som observasjonene i dette kaset ikke kan dokumentere. Det kan heller ikke utelukkes at enkelte små varianter av Demodex folliculorum kan ha vært Demodex brevis. Videre ble parasittens evne til å påvirke øyelokkets funksjoner delvis argumentert ut i fra størrelsen på de histologiske strukturene. Preparering av humant vev kan føre til strukturelle endringer, og det kan ikke utelukkes at de målte verdiene fraviker fra de verdiene som vevet har i levende tilstand. Det ble også observert histologiske forskjeller mellom vevet fra den yngste og den eldste donoren. Med vev fra kun fire donorer er det mulig at disse forskjellene kun representerer naturlige in-

dividuelle forskjeller fremfor aldersrelaterede endringer. Disse feilkildene vil likevel ikke endre hovedargumentene som promoterer i dette kasuset.

## Konklusjon

Parasitten Demodex har biomekaniske egenskaper som gjør den i stand til å påvirke øyelokkenes strukturelle og funksjonelle organisering. Den spiller derfor trolig en rolle i etiologien til DES og et bredt spekter av øvrige okulære lidelser assosiert med sekretoriske dysfunksjoner og inflammasjon. Det er behov for ytterligere forskning på denne parasitten for å kartlegge dens livsbetingelser og vekstforhold, likeledes for å finne behandlingsmetoder som effektivt kan redusere antall parasitter ned til et asymptotisk nivå. De øvrige konklusjonene som kan trekkes på basis av litteraturen og dette studiet er oppsummert nedenfor.

- Parasitten Demodex kan påvises hos majoriteten av den voksne delen av befolkningen med enkle kliniske metoder.
- Parasitten gir i de fleste tilfeller ingen symptomer, men er opportunistisk av natur.
- Forekomsten kan øke ved systemiske lidelser, nedsatt immunitet, stress, depresjon og øvrige faktorer som fører til redusert allmenntilstand.
- Kan gi inflammasjon, trolig på basis av både mekanisk og immunologisk irritasjon.
- Parasitten har fysiologiske forutsetninger til å skape hyperplasi og hyperkeratinisering av epitelcellene i follikler og talgkjertler. Dette kan føre til obstruksjon av talgkjertlenes munninger.
- Demodex er trolig en medvirkende årsak til både MGD og DES.
- Den karakteristiske avleiringen på ciliene, "cylindrical dandruff", er en indikasjon på Demodex og ansett som patognomisk for demodikose.
- Tilfeller av inflammasjon som ikke responderer på antibiotika kan være forårsaket av Demodex.
- Konturene av parasitten kan observeres i spaltelampe, men er ofte maskert av sekret og de avleiringer den forårsaker.
- Parasitten identifiseres best ved å epilere cilier (vippe ekstraksjon), som deretter inspiseres i lysmikroskop. Parasittens karakteristiske form kan identifiseres selv under lav forstørrelse.
- Kontrastfremmende stoffer gjør det enklere å påvise parasitten i lysmikroskop.
- Behandling i form av okulær hygiene og bruk av antiseptiske midler kan i mange tilfeller redusere forekomsten ned til et asymptotisk nivå.

## References

- Bevins, C. L., & Liu, F. T. (2007). Rosacea: skin innate immunity gone awry? *Nature Medicine*, 13(8), 904–906. doi:10.1038/nm0807-904.
- Ding, X. K., Li, F., & Wang, Y. P. (1992). Scanning electron microscopic observation on Demodex brevis. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 10(3), 225–226.
- Gao, Y. Y., Di Pascuale, M. A., Elizondo, A., & Tseng, S. C. (2007). Clinical treatment of ocular demodocosis by lid scrub with tea tree oil. *Cornea*, 26(2), 136–143. doi:10.1097/01.icc.0000244870.62384.79
- Gao, Y. Y., Di Pascuale, M. A., Li, W., Liu, D. T.-S., Baradaran-Rafii, A., Elizondo, A., ... Tseng, S. C. (2005). High prevalence of Demodex in eyelashes with cylindrical dandruff. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 46(9), 3089–3094. doi:10.1167/iovs.05-0275
- Hu, L., Zhao, Y. E., Cheng, J., & Ma, J. X. (2014). Molecular identification of four phenotypes of human Demodex in China. *Experimental Parasitology*, 142, 38–42. doi:10.1016/j.exppara.2014.04.003
- Ilsa, N. H., Loong, L. W., Fang, G. H., Mohamad, A. M., Razali, N., Rani, N. I., ... Abdullah, S. R. (2011). Demodicosis among university medical students in Malaysia and the effects of facial cleanser and moisturizer usage. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 42(6), 1375–1380.
- Jackson, W. B. (2008). Blepharitis: current strategies for diagnosis and management. *Canadian Journal of Ophthalmology*, 43(2), 170–179. doi:10.3129/i08-016.
- Jing, X., Shuling, G., & Ying, L. (2005). Environmental scanning electron microscopy observation of the ultrastructure of Demodex. *Microscopy Research and Technique*, 68(5), 284–289. doi:10.1002/jemt.20253
- Koo, H., Kim, T. H., Kim, K. W., Wee, S. W., Chun, Y. S., & Kim, J. C. (2012). Ocular Surface discomfort and demodex: effect of tea tree oil eyelid scrub in demodex blepharitis. *Journal of Korean Medical Science*, 27(12), 1574–1579. doi:10.3346/jkms.2012.27.12.1574
- Lacey, N., Delaney, S., Kavanagh, K., & Powell, F. C. (2007). Mite-related bacterial antigens stimulate inflammatory cells in rosacea. *British Journal of Dermatology*, 157(3), 474–481. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.08028.x
- Lacey, N., Kavanagh, K., & Tseng, S. C. G. (2009). Under the lash: Demodex mites in human disease. *The Biochemist (London)*, 31(4), 2–6.
- Lee, S. H., Chun, Y. S., Kim, J. H., Kim, E. S., & Kim, J. C. (2010). The relationship between demodex and ocular discomfort. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(6), 2906–2911. doi:10.1167/iovs.09-4850
- Li, J., O'Reilly, N., Sheha, H., Katz, R., Raju, V. K., Kavanagh, K., & Tseng, S. C. (2010). Correlation between ocular demodex infestation and serum immunoreactivity to bacillus proteins in patients with facial rosacea. *Ophthalmology*, 117(5), 870–877. doi:10.1016/j.ophtha.2009.09.057
- Liu, J., Sheha, H., & Tseng, S. C. G. (2010). Pathogenic role of demodex mites in blepharitis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 10(5), 505–510. doi:10.1097/ACI.0b013e32833df9f4
- Moss, S. E., Klein, R., & Klein, B. E. (2000). Prevalence of and risk factors for dry eye syndrome. *Archives of Ophthalmology*, 118(9), 1264–1268. doi:10.1001/archophth.118.9.1264
- Nichols, K. K., Foulks, G. N., Bron, A. J., Glasgow, B. J., Dogru, M., Tsubota, K., ... Sullivan, D. A. (2011). The international workshop on meibomian gland dysfunction: executive Summary. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(4), 1922–1929. doi:10.1167/iovs.10-6997a
- Ohashi, Y., Ishida, R., Kojima, T., Goto, E., Matsumoto, Y., Watanabe, K., ... Tsubota, K. (2003). Abnormal protein profiles in tears with dry eye syndrome. *American Journal of Ophthalmology*, 136(2), 291–299. doi:10.1016/S0002-9394(03)00203-4
- O'Reilly, N., Gallagher, C., Reddy Katikireddy, K., Clynes, M., O'Sullivan, F., & Kavanagh, K. (2012). Demodex-associated Bacillus proteins induce an aberrant wound healing response in a corneal epithelial cell line: possible implications for corneal ulcer formation in ocular rosacea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 53(6), 3250–3259. doi:10.1167/iovs.11-9295
- Rather, P. A., & Hassan, I. (2014). Human demodex mite: the versatile mite of dermatological importance. *Indian Journal of Dermatology*, 59(1), 60–66. doi:10.4103/0019-51540123498
- Rusiecka-Ziółkowska, J., Nokił, M., & Fleischer, M. (2014). Demodex – An old pathogen or a new one? *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 23(2), 295–298.
- Simon, G. (1842). Über eine in den kranken und normalen haarsäcken des menschen lebende milbe. *Archiv für Anatomie, Physiologie und Wissenschaftliche Medicin*, 218–249.
- Vargas-Arzola, J., Reyes-Velasco, L., Segura-Salvador, A., Márquez-Navarro, A., Díaz-Chiguer, D. L., & Noguera-Torres, B. (2012). Prevalence of demodex mites in eyelashes among people of Oaxaca, Mexico. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 59(2), 257–262. doi:10.1556/AMicr.59.2012.2.10