

WPŁYW CYDECTINU NA PRZEŻYWALNOŚĆ LARW DRUGIEGO STADIUM ORAZ OSOBNIKÓW DOROSŁYCH *ASCARIS SUUM* W HODOWLI *IN VITRO*

KRYSTYNA ŻÓŁTOWSKA, BEATA KUROWICKA I DOROTA ŁUKASZEWICZ

Katedra Biologii Ogólnej Instytutu Biologii i Ochrony Środowiska, WSP
10-561 Olsztyn, ul. Żołnierska 14

THE INFLUENCE OF CYDECTIN ON THE SURVIVAL RATE OF SECOND STAGE LARVAE, AND MATURE *ASCARIS SUUM* *IN VITRO*

Abstract. Larvae of *Ascaris suum* (L₂) newly hatched from eggs with sodium hypochlorite, were placed (2000 larvae per 2 ml) of culture in EAGLE's medium, containing 10% calve serum or without it. Moxidectin (Cydectin) was introduced into medium in concentrations: 5, 10, 25 and 50 µg/ml. The cultures were incubated for 3 days, and there were controlled every 12 hours. The effect of drug on survival of larvae was slightly expressed. After 3 days survival rates were 87, 81, 80 and 78% in medium with serum, respectively to moxidectin concentrations. The lethality of larvae was higher in medium without serum, and amounted to 17, 23, 29 and 31% in comparison with control probe after 72 hours.

Adult *Ascaris* were placed on ARS medium with glucose (0.1%) containing moxidectin in concentrations 1, 5, 50 and 100 µg/ml. The worms' condition was examined every day based on motility and turgor of their body. After 15 days of incubation in control probe 50% worms were alive, but their vitality was reduced. The behaviour of *Ascaris* in the presence of 50 µg/ml moxidectin was similar to those from the control. Only the highest concentration of drug (100 µg/ml) was lethal in 100% on the 8th day. The lower moxidectin concentrations (1 and 5 µg/ml) were not lethal to adult worms, they had even the positive effect on survival rate and condition of adult *Ascaris*.

The eggs laid by females which were maintained in culture with drug were collected. There were no disturbances in their future development.

WSTĘP

Wchodząca w skład preparatu Cydectin moksydektyna jest makrocyclicznym laktonem, powstającym po chemicznej modyfikacji nemadektyny, naturalnego produktu fermentacji bakterii *Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus*. Moksydektyna zaliczana jest do nowej generacji endoktycydów o wysokiej skuteczności wobec zewnętrznych i wewnętrznych pasożytów bydła i owiec (LONNEUX i LOSSON 1992, POMROY i wsp. 1992, SCHOLL i wsp. 1992, WILLIAMS i wsp. 1992, CHICK i wsp. 1993, CONDER i wsp. 1993, GRZYWIŃSKI i wsp. 1993, LOSSON i LONNEUX 1993, OOSTHUIZEN i wsp. 1993, POMROY i WHELAN 1993, ROLFE i BORAY 1993).

Badania nad przydatnością Cydectinu do zwalczania pasożytów świń przeprowadzili GUNDŁACH i wsp. (1992, 1994). Lek eliminował inwazje *Sarcoptes scabiei suis* oraz nicieni *Strongyloides ransomi* i *Trichuris suis*. Nieco niższą jego skuteczność obserwowali cytowani autorzy w stosunku do *Oesophagostomum dentatum*. Natomiast u zwierząt zarażonych *Ascaris suum* stwierdzali tylko obniżenie intensywności inwazji. ŻÓŁTOWSKA i KUROWICKA (1996) obserwowały działanie owostatyczne moksydektyny w stosunku do jaj glisty świńskiej jedynie przy bardzo wysokich stężeniach (25 i 50 µg/ml).

Celem niniejszej pracy było prześledzenie w warunkach *in vitro* wpływu leku na przeżywalność inwazyjnych larw (L₂) oraz dorosłych osobników *A. suum*.

Material i metody

Badano działanie handlowego preparatu (ser. nr 92/14) Cydectin, (Co. Cyanamid SA) w formule do iniekcji, zawierającego 1% roztwór moksydektyny. Materiałem były dorosłe osobniki oraz inwazyjne larwy glisty świńskiej.

Dorosłe osobniki *A. suum* pozyskiwano w Zakładach Mięsnych w Olsztynie. Do laboratorium transportowano je w ciepłym, zmodyfikowanym przez Ho i wsp. (1992) roztworze RINGERA dla *Ascaris* (ARS), zawierającym następujące sole (w g/l): KCl – 1,83; CaCl₂ + 2H₂O – 1,73; MgCl₂ + 6H₂O – 1,99; NaCl – 0,23; octan sodu – 10,25 oraz glukozę – 1 g. Roztwór ARS buforowano 3 mM HEPES, doprowadzając jego pH do 7,4. Glisty płukano w tym roztworze, po dodaniu 1,2 ml j.m. penicyliny oraz 1 g nystatyny na 1 litr.

1. Badanie wpływu leku na larwy *A. suum*

1.1. Otrzymywanie L₂ glisty

Z ciała samic izolowano macice, które płukano w ARS z dodatkiem antybiotyków. Z ich końcowych odcinków pobierano jaja, które następnie przenoszono do krystalizatora z 0,1N HCl i inkubowano w temp. 28°C aż do osiągnięcia stadium inwazyjnego. Z jaj inwazyjnych pozyskiwano larwy drugiego stadium. Wstępne ich wyzwalanie przeprowadzono w roztworze 5,25% podchlorynu sodu w 0,5N NaOH, zgodnie z metodą PITTS (1963). Stopień uszkodzenia otoczki jajowej kontrolowano w mikroskopie świetlnym. W momencie, gdy larwę otaczała tylko jedna osłona, wypłukiwano podchloryn sodu wirując 10-krotnie jaja w 0,9% NaCl. W następnym etapie procesu wylęgania postępowano zgodnie z metodą CLARKE i PERRIEGO (1988). Kolby ERLÉNMYERA, zawierające zawieszony w medium EAGLEGO jaja pasożyta, gazowano CO₂ w temp. 37°C do czasu wyzwolenia się ponad 90% larw.

1.2. Badanie przeżywalności larw

Żywe larwy oddzielono od reszty materiału powylęgowego metodą BAERMANN. Dzielono je na grupy po 2 tys. osobników i umieszczano w „peni-

cylinówkach”, zawierających po 2 ml podłoża EAGLE’go. W połowie prób podłoże to było uzupełnione 10% surowicą wołową. Do hodowli wprowadzono Cydectin w takich ilościach, by zawartość moksydektyny wynosiła kolejno 5, 10, 25 i 50 μg w 1 ml podłoża. Hodowlę prowadzono w 38°C przez 3 doby. Przeżywalność larw oceniano po 24 godz. inkubacji i później co 12 godz. W tym celu z każdej penicylinówki pobierano 9 prób o objętości 30 μl i liczono larwy. Określano procent żywych, ruchliwych larw. Wszystkie operacje przeprowadzano, w miarę możliwości, w warunkach jałowych.

2. Wpływ leku na dorosłe postaci *A. suum*

Umieszczono po 10 osobników o zbliżonych rozmiarach ciała w 500 mililitrowych plastikowych tryskawkach, napełnionych ciepłym ARS z dodatkiem 1, 5, 50 i 100 μg moksydektyny na 1 ml. Hodowlę prowadzono w temp. 38°C. Obserwacje żywotności oraz ocenę sprężystości glist dokonywano codziennie podczas wymiany podłoża na świeże.

3. Rozwój jaj pozyskiwanych od samic inkubowanych z lekiem

Złożone w roztworze leku jaja zagęszczano za pomocą dekantacji. Płukano je kilkakrotnie w napowietrzanej wodzie destylowanej, po czym zakładano ich hodowle. Rozwój zarodków i larw w jajach kontrolowano raz w tygodniu.

Wyniki

W warunkach naszego doświadczenia wpływ leku na przeżywalność inwazyjnych larw glisty świńskiej był niewielki (tab. 1), z tym, że wyraźniej zaznaczało się działanie moksydektyny w hodowlach nie zawierających w podłożu surowicy bydlęcej. Niemniej różnice między wynikami dotyczącymi toksyczności leku dla larw w hodowlach z dodatkiem i bez surowicy nie były statystycznie istotne. Jedynie statystycznie istotne różnice odnotowano między próbami kontrolnymi a hodowanymi z 25 i 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leku, po trwającej odpowiednio 60 i 72 godz. inkubacji w medium bez dodatku surowicy (tab. 1). W pozostałych przypadkach nie obserwowano istotnych różnic w letalności larw wskutek obecności moksydektyny, wielkości jej dawki, ani czasu działania środka.

W próbach zawierających surowicę bydlęcą obumierało po 3 dobach inkubacji w leku 13, 19, 20 i 22% larw w stosunku do kontroli. Letalność, jak już wspomniano, była wyższa, gdy podłoże nie zawierało surowicy, i wynosiła po tym samym czasie około 17, 23, 29 i 32%, odpowiednio do stężeń moksydektyny wynoszących 5, 10, 25 i 50 μg w 1 ml medium EAGLE’go.

Również w uśmiercaniu osobników dorosłych *A. suum* lek był mało skuteczny. Bardzo wysokie jego stężenie (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ w przeliczeniu na moksydektynę) powodowało obumieranie glist dopiero po 8 dniach. Obserwowano wtedy zmiany w kutikuli, głównie w obrębie głowowej części ciała. Niższe koncentracje Cydectinu nie wpływały ujemnie na przeżywalność robaków.

TABELA 1

Wpływ moksydektyny na letalność (%) larw drugiego stadium *Ascaris suum* hodowanych w medium EAGLE'go

TABLE 1

Influence of moxidectin on the lethality (%) of second stage of *Ascaris suum* larvae in EAGLE medium

Lek Drug µg/ml	Czas (godz.) – Time (h)					
	12	24	36	48	60	72
a. z 10% surowicą bydłą – with 10% bovine serum						
0	(1,8±0,3) 100	(2,3±1,2) 100	(10,8±2,6) 100	(18,3±4,4) 100	(26,1±6,7) 100	(28,3±8,1) 100
5	2,1±1,0	8,6±3,4	8,9±4,2	8,8±3,7	10,6±4,6	13,2±6,1
10	2,4±0,8	8,2±4,1	12,1±4,7	15,8±6,9	16,7±4,1	19,1±6,5
25	2,6±0,2	12,2±5,1	14,7±2,1	15,9±6,1	18,4±7,4	20,4±8,9
50	2,1±0,3	13,1±6,3	14,6±6,1	18,2±5,4	19,7±8,1	22,3±8,2
b. bez surowicy bydłej – without bovine serum						
0	(1,1±0,4) 100	(6,3±1,7) 100	(17,8±6,1) 100	(22,3±7,4) 100	(31,3±10,1) 100	(35,0±11,2) 100
5	2,1±0,3	12,9±6,2	12,1±3,7	15,4±4,9	16,8±7,1	17,2±6,8
10	2,6±1,4	9,7±5,1	13,4±5,8	16,2±3,7	19,6±4,6	23,4±8,1
25	2,8±0,9	13,8±4,6	18,6±4,9	19,0±5,1	26,3±8,6	29,1±6,4*
50	2,4±1,1	14,2±6,4	21,2±3,6	23,4±7,1	28,0±5,7*	31,6±8,6*

W nawiasach letalność w hodowli kontrolnej bez leku (In the parenthesis the lethality in control medium)

* – Różnica statystycznie istotna, $p < 0,05$ (Statistical significance, $p < 0,05$)

TABELA 2

Przeżywalność osobników dorosłych *Ascaris suum* w medium ARS zawierającym moksydektynę

TABLE 2

The survivability of mature *Ascaris suum* in ARS with moxidectin

Dawka Dose µg/ml	Dni – Days		
	5	10	15
1	100 (+++)	75±5 (+++)	75±8 (+++)
5	75±6 (+++)	50±5 (++)	50±6 (++)
50	75±5 (++)	50±2 (++)	50±10 (+)
100	75±10 (+)	0	0
0	90±5 (+++)	90±10 (++)	50±5 (+)

Ruchliwość glist: (+++) – bardzo ruchliwe; (++) – ruchliwe; (+) – ruchliwość słaba
The mobility of worms: (+++) – high; (++) – middle, (+) – low

Obserwowano nawet pozytywny wpływ preparatu w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ na przeżywalność populacji. W tych warunkach, po 15 dniach hodowli, przeżywało aż ok. 75% glist; były one bardzo ruchliwe. Po tym samym czasie w hodowli kontrolnej oraz w obecności leku w stężeniach 5 i 50 $\mu\text{g/ml}$ przeżywało tylko ok. 50% osobników, a ich żywotność była znacznie niższa niż na początku eksperymentu, a także gorsza niż u glist inkubowanych z 1 $\mu\text{g/ml}$ moksydektyny (tab. 2).

Jaja złożone przez samice *A. suum* przebywające w środowisku zawierającym lek rozwijały się normalnie. Nie obserwowano znaczących różnic w ilości rozwijających się do stadium inwazyjnego jaj, pochodzących od samic kontrolnych i inkubowanych z lekiem (tab. 3).

TABELA 3

Procent jaj inwazyjnych od samic *Ascaris suum* inkubowanych w ARS zawierającym moksydektynę (50 $\mu\text{g/ml}$)

TABLE 3

Percentage of invasive *Ascaris suum* eggs obtained from females incubated with moxidectin (50 $\mu\text{g/ml}$)

% jaj inwazyjnych z hodowli	Dni hodowli glist – Days of culture							
	3	4	5	6	7	8	9	10
Kontrola Control	85	86	88	82	80	80	70	75
Z lekiem With drug	86	87	79	84	83	78	75	73

Omówienie i dyskusja

Hodowle *in vitro* są dobrym sposobem służącym do oceny efektywności działania leków przeciwbaczych (REW i wsp. 1986, WAGLAND i wsp. 1992, ROTHWELL i SANGSTER 1993).

REW i wsp. (1986) opisali przydatność biotestu, w którym wykorzystywano hodowle *in vitro* larw *A. suum* dla oceny skuteczności działania kilku leków z grupy benzimidazoli oraz tetramizolu, closantelu i piperazyny. Stwierdzili występowanie dużej zbieżności między efektami działania tych środków w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Wszystkie badane przez nich antyhelmintyki w stosunku do stadium L₂ były skuteczne w bardzo niskich stężeniach (0,01 $\mu\text{g/ml}$), natomiast larwy późniejszych stadiów były bardziej odporne na działanie leków. Niemniej dawka 10 $\mu\text{g/ml}$ (z wyjątkiem piperazyny) była wystarczająca dla uzyskania wysokiego procentu śmiertelności u stadiów L₃ i L₄.

Obecnie testowano toksyczność moksydektyny w stężeniach 5–50 µg/ml w stosunku do L₂ *A. suum*. Najniższą dawkę ustalono *a priori* na podstawie obliczeń, tak by stężenie leku, zakładając że nastąpi całkowite wchłanianie związku czynnego, było 2–3-krotnie wyższe od spodziewanego w surowicy żywiciela wg dozy podanej przez GUNDLACHA i wsp. (1994) – 0,3 mg/kg masy ciała. W rzeczywistości stężenie leku mogło być inne od założonego. Przykładowo VELEBNY i wsp. (1991) u zwierząt laboratoryjnych, którym podawano fenbendazol, oznaczali znacznie niższe stężenie leku w surowicy i mięśniach myszy zarażonych *Trichinella spiralis* i *Nippostrongylus brasiliensis* niż u zwierząt wolnych od inwazji. W dostępnej literaturze nie napotkano doniesień dotyczących stężenia leku w tkankach i płynach ustrojowych świń leczonych moksydektyną. Nie mniej wydaje się, że 2–3-krotnie wyższe dawki leku zastosowane obecnie, przekraczają jego stężenie występujące u leczonych Cydectinem zwierząt.

Uzyskane wyniki wskazują na małą skuteczność leku w warunkach *in vitro* w stosunku do L₂ i osobników dorosłych *A. suum*. Jest to zgodne z doniesieniami GUNDLACHA i wsp. (1992, 1994), którzy obserwowali ograniczoną skuteczność moksydektyny w zwalczaniu glistnicy świń. Następowo bowiem obniżenie intensywności inwazji, ale nie zupełne wyleczenie. Autorzy u niektórych grup zwierząt odnotowali nawet wzrost intensywności i ekstensywności zarażenia. Zaznaczało się to po 3 tygodniach od leczenia, co sugeruje zdaniem GUNDLACHA i wsp. (1992) osiągnięcie przez pasożyta stadium dorosłego, patentnego. Wyniki uzyskane obecnie zdają się potwierdzać to spostrzeżenie. Natomiast inna obserwacja wspomnianych autorów, tzn. wydalanie licznych dorosłych pasożytów z kałem leczonych zwierząt jest zastanawiająca. Według naszych badań lek praktycznie nie działał, poza bardzo wysoką dawką 100 µg/ml, na dorosłe osobniki *A. suum*. Być może mechanizm leżący u podstaw usuwania glist z organizmu leczonych świń jest inny niż porażenie mięśni. Na podstawie piśmiennictwa (SHOOP 1993, CONDER i wsp. 1993), które sugerowało działanie moksydektyny na GABA receptory błony mięśniowej pasożyta, spodziewano się wystąpienia paraliżu u nicieni. W warunkach obecnego doświadczenia nie obserwowano wpływu leku na ruchliwość glist.

Nie można całkowicie wykluczyć występowania u glisty oporności w stosunku do leku. Z literatury znane są przypadki pojawiania się kooporności na moksydektynę u pasożytniczych nicieni owiec i bydła, które wcześniej nabyły oporność na ivermektynę (BESIER i wsp. 1993, SHOOP 1993, CONDER i wsp. 1993).

CARVALHO i wsp. (1991) obserwowali rozwój jaj uzyskanych od samic *A. lumbricoides*, pochodzących od leczonych tiabendazolem lub levamizolem pacjentów. W pierwszym przypadku zarodki w jajach nie rozwijały się, w drugim zaś działanie owostatyczne levamizolu określono na 0–98%. Nasze badania nie wykazały wpływu moksydektyny na późniejszy rozwój zarodków w jajach *A. suum*, pochodzących od samic wcześniej przebywających w leku.

Uzupełnia to i jest zgodne z wcześniejszymi wynikami, dotyczącymi wpływu obecności Cydectinu w medium hodowlanym na rozwój jaj *A. suum* (ŻÓŁTOWSKA i KUROWICKA 1996). Otóż nie obserwowano zaburzeń w rozwoju zarodków glisty, gdy jaja poddano działaniu leku tylko przed rozpoczęciem embriogenezy (po czym lek był usuwany ze środowiska hodowli), a dopiero przedłużona ekspozycja (na 25 i 50 µg/ml leku) w czasie bruzdkowania zarodka powodowała poważne zmiany rozwojowe.

LITERATURA

- BESIER R. B., LYON J., KIERAN P. J. 1993. The effect of moxidectin against benzimidazole- and levamisole-resistant nematodes of sheep in Western Australia. *Aust. Vet. J.* 70: 422-423.
- CARVALHO O. S., GUERRA H. L., MASSARA C. L. 1992. Development of *Ascaris lumbricoides* eggs from females eliminated after chemotherapy in man. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* (Rio de Janeiro) 87: 49-51.
- CHICK B., McDONALD D., COBB R., KIERAN P. J., WOOD I. 1993. The efficacy of injectable and pour-on formulations of moxidectin against lice on cattle. *Aust. Vet. J.* 70: 212-213.
- CLARKE A., PERRY R. N. 1988. The induction of permeability in egg-shell of *Ascaris suum* prior to hatching. *Int. J. Parasitol.* 18: 987-990.
- CONDER G. A., THOMPSON D. P., JOHNSON S. S. 1993. Demonstration of co-resistance of *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin. *Vet. Rec.* 26: 651-652.
- GRZYWIŃSKI L., RAMISZ A., ROMANIUK K., BALICKA-LAURANS A. 1993. Przydatność Cydectinu do zwalczania pasożytów u bydła i owiec. *Med. Wet.* 49: 520-522.
- GUNDŁACH J. L., SADZIKOWSKI A. B., TOMCZUK K. 1994. Przydatność moksydektyny do eliminacji pasożytów wewnętrznych i świerzbowców u świń w różnych systemach utrzymania. *Ibid.* 50: 72-74.
- — — UCHACZ S. 1992. Przydatność preparatów zawierających moksydektynę do zwalczania pasożytów świń. *Ibid.* 48: 209-211.
- HO N. F. H., GEARY T. G., BARSUHN C. L., SIMS S. M., THOMPSON D. P. 1992. Mechanistic studies in the transcuticular delivery of antiparasitic drugs II: *ex vivo/in vitro* correlation of solute transport by *Ascaris suum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52: 1-14.
- LONNEUX J. F., LOSSON B. 1992. Field efficacy of injectable and pour-on moxidectin in cattle naturally infested with *Psoroptes ovis* (Acarina: Psoroptidae). *Vet. Parasitol.* 45: 147-152.
- LOSSON B., LONNEUX J. F. 1993. Une estimation de l'activite remanente de la moxidectine 1% injectable chez le betail infeste par le premier stade larvaire d'*Hypoderma* sp.. *Ann. Med. Wet.* 137: 105-108.
- OOSTHUIZEN W. T. J., ERASMUS J. B., BOELEMA E., GROVE T. 1993. Efficacy of moxidectin against internal parasites of sheep. *J. S. Afr. Vet. Ass.* 64: 28-30.
- PITTA T. D. 1963. *In vitro* cultivation of newly hatched larvae of *Ascaris* from man and swine. *J. Parasitol.* 49: 1034-1036.
- POMROY W. E., WHELAN N. C. 1993. Efficacy of moxidectin against an ivermectin-resistant strain of *Ostertagia circumcincta* in young sheep. *Vet. Rec.* 17: 416.
- — ALEXANDER A. M., WEST D. W., STAFFORD K., ADLINGTON B. A., CALDER S. M. 1992. Multiple resistance in goat-derived *Ostertagia* and the efficacy of moxidectin and combinations of other anthelmintics. *N. Z. Vet. J.* 40: 76-78.
- REW R. S., URBAN J. F., DOUVRES F. W. 1986. Screen for anthelmintics, using larvae of *Ascaris suum*. *Am. J. Vet. Res.* 47: 869-873.

- ROLFE P. F., BORAY J. C. 1993. Comparative efficacy of moxidectin, an ivermectin/clorsulon combination and closantel against immature paramphistomes in cattle. *Aust. Vet. J.* 70: 265-266.
- ROTHWELL J. T., SANGSTER N. C. 1993. An *in vitro* assay utilising parasitic larval *Haemonchus contortus* to detect resistance to closantel and other anthelmintics. *Int. J. Parasitol.* 23: 573-578.
- SCHOOL P. J., GUILLOT F. S., WANG G. T. 1992. Moxidectin: systemic activity against common cattle grubs (*Hypoderma lineatum*) (Diptera: Oestridae) and trichostrongyle nematodes in cattle. *Vet. Parasitol.* 41: 203-209.
- SHOOP W. L. 1993. Ivermectin resistance. *Parasitol. Today* 5: 154-159.
- VELEBNY S., TOMASOVICOVA O., STPICZYŃSKA R., TURCEKOVA L. 1991. Effect of *Trichinella spiralis* and *Nippostrongylus brasiliensis* infection on the content of fenbendazole in serum and muscles of laboratory animals. *Acta Parasitol. Pol.* 36: 55-58.
- WAGLAND B. M., JONES W. O., HRIBAR L., BENDIXSEN T., EMERY D. L. 1992. A new simplified assay for larval migration inhibition. *Int. J. Parasitol.* 22: 1183-1185.
- WILLIAMS J. C., BARRAS S. A., WANG G. T. 1992. Efficacy of moxidectin against gastrointestinal nematodes of cattle. *Vet. Rec.* 131: 345-347.
- ŻÓŁTOWSKA K., KUROWICKA B. 1996. Rozwój jaj *Ascaris suum* w obecności moksydektyny. *Wiad. Parazytol.* 42: 205-212.

Otrzymano 30 VI 1994, zaakceptowano 14 VI 1996