

STEFAN STĘPKOWSKI, STANISŁAW KLIMONT

Działanie niektórych środków leczniczych na *Histomonas meleagridis* w hodowli in vitro

Z Zakładu Chorób Drobni Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

W walce z histomonadozą („czarną główką”) ptaków ważną rolę spełniają środki farmakologiczne o działaniu pierwotniakobójczym. Środki te aktualnie stanowią podstawowe ogniwo profilaktyki histomonadozy, a w razie wystąpienia choroby są wykorzystywane do jej opanowania. Ze środków tych do niedawna duże zainteresowanie badaczy wzbudzały pochodne nitroiazolu: Enheptin T tj. 2-amino-5-nitroiazol (8, 13), Enheptin A tj. 2-acetyloamino-5-nitroiazol (14), Acinitrazol (Aminitrozol, Avionizol-Polfa) tj. 2-acetamido-5-nitroiazol (3, 6), a w ostatnich latach pochodne nitroimidazolu: Dimetridazol (Emtryl) tj. 1,2-dimetyl-5-imidazol (10, 11, 12), Ipronidazol tj. 1-metylo-2-izopropyl-5-nitroimidazol (15, 17), Metronidazol (Avimetronid-Polfa) tj. 2-hydroksyetylo-1-metylo-2-nitro-5-imidazol (3, 4), Tinidazol tj. 1-[2-(etylsulfonyl)etylo]-2-metyl-5-nitroimidazol (7) i inne (16, 18).

W nadziei na poszerzenie arsenału leków o działaniu histomonadobójczym podjęto badania na wpływem szeregu innych środków leczniczych o nieznaney dotychczas aktywności w stosunku do *H. meleagridis*.

Materiał i metody

Postanowiono przebadac — w porównaniu do Metronidazolu — aktywnosc histomonadobojczą 12 środków leczniczych: sulfachloropirazyiny, formosulfatiazolu, błękitu metylenowego, tiabendazolu, tetramizolu, etakrydyny, chlorchinaldiny, antazoliny, siarczanu miedzi, Monensinu, Lasalocidu i Tinidazolu. Badania przeprowadzono przy użyciu monoksenicznych hodowli *H. meleagridis* (szcypy Hm-L1, Hm-1H, Hm-R). Do namnażania pierwotniaka stosowano pożywkę ES z surowicą końską (19), przy czym biologicznym stymulatorem wzrostu w hodowli każdego z 3 szczepów *H. meleagridis* był ten sam szczep *Escherichia coli*, serotyp 074:K2 (20).

Wstępna selekcja leków polegała na ustaleniu aktywności dawki 100 mcg/ml każdego z terapeutyków w stosunku do jednego ze szczepów *H. meleagridis*. Badania wykonano w próbkach o wymiarach 100×10 mm, zawierających po 3 ml jałowej pożywki ES. Do poszczególnych próbek wprowadzano po 300 mcg jednego z 13 środków leczniczych, a następnie wsiewano do każdej z nich po 15×10⁴ pierwotniaków, uzyskanych z 48 godz. hodowli *H. meleagridis* Hm-L1. Po tym czasie pobierano z dna każdej próbki 0,05 ml materiału, który posiewano na świeżą pożywkę ES. Wtórne (kontrolne) posiewy sprawdzano na obecność namnożonych pasożytów po dalszych 48 godz. inkubacji w cieplarni. Leki, które w dawce 100 mcg/ml nie zabijały pierwotniaków uznawano za niedostatecznie aktywne i eliminowano z dalszych badań.

Jednocześnie z wstępną selekcją leków przebadano stopień wrażliwości na ich działanie szczepu *E. coli*, użytego do stymulowania wzrostu pasożyta. W tym celu do poszczególnych próbek z jałową pożywką ES dodawano najpierw po 100 mcg/ml jednego z terapeutyków, a następnie posiewano pożywkę kilkoma kroplami płynnej hodowli *E. coli*. Po 48 godz. inkubacji posiewów sprawdzano wizualnie, mikroskopowo

i drogą posiewów na płytki agarowe stan namnożenia *E. coli*.

Właściwe badania objęły 8 wyselekcjonowanych terapeutyków, a mianowicie: etakrydynę, chlorchinaldinę, antazolinę, siarczan miedzi, Monensin, Lasalocid, Tinidazol oraz Metronidazol. Dla poszczególnych leków przygotowano po 3 rzędy próbek z 3 ml jałowej pożywki ES. Następnie do próbek każdego z rzędów dodawano malejące ilości jednego ze środków leczniczych, rozpoczynając od dawki 100 mcg/ml, a kończąc na dawce 0,5 mcg/ml. Z kolei cały rząd próbek posiewano jednym z 3 szczepów *H. meleagridis*, wprowadzając do każdej próbki 15×10⁴ pierwotniaków. Jednocześnie każdy ze szczepów posiewano na 1 próbkę z pożywką ES bez dodatku któregośkolwiek z leków; próbki te stanowiły punkt odniesienia dla czasokresu przeżywalności pierwotniaka w zastosowanych warunkach doświadczalnych.

Po wprowadzeniu histomonad wszystkie próbki umieszczono w cieplarni, a następnie przy pomocy wysiewów z każdej z nich na świeżą pożywkę ES, dokonanych najpierw po 48 godz., a następnie co 24 godz. ustalono czas obumierania pierwotniaków.

Wyniki i omówienie

Z wstępnego badania, które polegało na ustaleniu wrażliwości jednego ze szczepów *H. meleagridis* na dawkę 100 mcg/ml poszczególnych 13 leków wynikało, że 5 z tych terapeutyków nie wykazuje godnego uwagi działania histomonadobójczego (tab. 1). Do tych leków nale-

Tab. 1. Przeżywalność *Histomonas meleagridis* Hm-L1 oraz *Escherichia coli* 074:K2 pod działaniem dawki 100 mcg/ml leku

Nazwa leku	Namnożenie w posiewach kontrolnych	
	<i>H. meleagridis</i>	<i>E. coli</i>
Sulfachloropirazyina	+	+
Formosulfatiazol	+	+
Błękit metylenowy	+	+
Tiabendazol	+	+
Tetramizol	+	+
Etakrydyna	—	+
Chlorchinaldina	—	+
Antazolina	—	+
Siarczan miedzi	—	+
Monensin	—	+
Lasalocid	—	+
Tinidazol	—	+
Metronidazol	—	+
Kontrola	+	+

żały: sulfachloropirazyina, formosulfatiazol, błękit metylenowy, tiabendazol oraz tetramizol. Spośród pozostałych 8 środków leczniczych najbardziej aktywnym okazał się Metronidazol, a ponadto dość silnie działały Monensin i Tinidazol. Średnią aktywność histomonadobójczą

wykazały: etakrydyna, chlorchinaldina, antazolina i siarczan miedzi. Najslabiej w tej grupie leków działał Lasalocid (tab. 2).

Dotychczasowe doniesienia dotyczące roli niektórych terapeutyków w profilaktyce i leczeniu histomonadozy opierały się najczęściej na obserwacjach, dokonanych na ptakach. Wobec trudności, na jakie natrafiało namnażanie *in vitro* *H. meleagridis*, czynnika etiologicznego choroby, tylko nieliczni badacze usiłowali określić bezpośredni wpływ wybranych leków w stosunku do tego pierwotniaka (2, 6). Wprowadzenie do hodowli pierwotniaka pożywek, opartych na płynach tkankowych (5, 9, 19) ułatwiło prowadzenie tego rodzaju badań.

Tab. 2. Aktywność wybranych leków w stosunku do *Histomonas meleagridis* (szczepy Hm-L1, Hm-1H, Hm-R)

Nazwa leku	Okres obumierania histomonad (dni)					
	100 mcg	50 mcg	25 mcg	10 mcg	5 mcg	1 mcg
Etakrydyna	2	2	2	3	8-10	
Chlorchinaldina	r	2	2	8-10		
Antazolina	2	2	2	4	8-10	
Siarczan miedzi	r	2	2	8-10		
Monensin	2	2	2	2	3	8-10
Lasalocid	2	2	3	4	8-10	
Tinidazol	r	2	2	2	4	8-10
Metronidazol	r	r	r	2	2	8-10
Kontrola	8-10					

Objaśnienie: r — totalny rozpad pierwotniaków przed upływem 2 dni.

W niniejszych obserwacjach do hodowli *H. meleagridis* stosowano pożywkę ES, a jako stymulatora wzrostu pierwotniaka użyto drobnoustroju *E. coli* (20). Wstępne badanie wykazało, że żaden z 13 leków nie hamuje zdolności namnażania się w pożywce ES tego drobnoustroju (tab. 1). Fakt ten przemawiał ze bezpośrednim oddziaływaniem na pierwotniaka każdego z 8 aktywnych w stosunku do *H. meleagridis* terapeutyków, a przeciw możliwości obumierania histomonad na skutek zahamowania przez leki wzrostu *E. coli*.

Za najważniejszy wskaźnik histomonadobójczej aktywności leku przyjęto obumieranie pod jego wpływem pierwotniaka w okresie do 48 godz. W tym ujęciu terapeutykem o największej sile działania okazał się Metronidazol. Lek ten, którego antypierwotniacze właściwości pierwszy ustalił Cosar (4), powodował obumieranie *H. meleagridis* już w dawce 5 mcg/ml. Odkryty nieco później w grupie preparatów nitroimidazolowych Tinidazol wykazał identyczną aktywność przy dawce dwukrotnie wyższej — 10 mcg/ml. Te spostrzeżenia przeczą pogładowi Howesa i wsp., którzy skłonni są przypisywać Tinidazolowi silniejsze od Metronidazolu właściwości histomonadobójcze (7).

Tę samą co Tinidazol aktywność w stosunku do *H. meleagridis* wykazał Monensin (produkt *Streptomyces cinnamomensis*), stosowany w walcie z kokcydiozą. Natomiast w przypadku Lasalocidu, innego antybiotyku o właściwościach kokcydiostatycznych (wyzolowanego przez Bergera i wsp. ze *Stereptomyces lasalien-sis* (1) efekt obumierania pierwotniaków w okresie 48 godz. występował dopiero przy dawce 50 mcg/ml. Pozostałe leki, tj. etakrydyna, chlorchinaldina, antazolina i siarczan miedzi pod względem aktywności histomonadobójczej zajmowały miejsce pośrednie, powodując obumieranie *H. meleagridis* w dawce 25 mcg/ml.

Wyniki badań własnych wskazują, że poza Metronidazolem, który okazał się lekiem o szczególnie dużej aktywności w stosunku do *H. meleagridis*, w zwalczaniu i zapobieganiu histomonadozie ptaków mogą, jak się wydaje, znaleźć zastosowanie również Monensin oraz Tinidazol. Należy jednak liczyć się z koniecznością stosowania w tym celu nieco wyższych od Metronidazolu dawek obu tych leków.

Piśmiennictwo

- Berger J., Rachlin A. L., Scott W. E., Sternbarh L. H., Goldberg H. W.: J. Am. Chem. Soc. 73, 5295, 1951.
- Berks G., Neal R. A.: Ann. Trop. Med. Parasitol. 46, 68, 1952.
- Borzemska W. B.: Nowości Wet. 3, 152, 1973.
- Cosar C. S. J., Bonazet M.: Ann. Inst. Pasteur (Paris), 96, 238, 1959.
- Dwyer D. M.: J. Parasit. 56, 191, 1970.
- Horton-Smith C., Long P. L.: Ann. Trop. Med. Parasitol. 51, 117, 1957.
- Howes H. L. Jr., Lynch J. E., Kivlin J. L.: Antimicrob. Agents Chemother. 281-286, 1969.
- Joyner L. P., Kendall S. B.: Vet. Rec. 67, 180, 1955.
- Lesser E.: J. Parasit. 43, 686, 1950.
- Lucas J. B. M.: Vet. Rec. 73, 463, 1961.
- Lucas J. B. M.: Vet. Rec. 74, 759, 1962.
- Lucas J. B. M.: Vet. Rec. 75, 695, 1963.
- McCregor J. K.: Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 13, 257, 1949.
- McCregor J. K., Fergusson A. E., Connell M. C., Morrison M. D.: Poultry Sci. 43, 1026, 1964.
- Mitrovic M., Schildknecht E. G.: Poultry Sci. 48, 1845, 1969.
- Mitrovic M., Hojfer M., Schildknecht E. G.: Antimicrob. Agents Chemother. 445-448, 1959.
- Nelson F., Nelson R.: Poultry Sci. 48, 1850, 1969.
- Peterson F. H.: Poultry Sci. 47, 1245, 1968.
- Stenkowski S., Klimont S.: Medycyna Wet. 35, 502, 1979.
- Stenkowski S., Klimont S.: Wied. parazyt. (w druku).

Adres autora: prof. dr Stefan Stenkowski, ul. Langiewiczza 3/6, 20-032 Lublin.

Степковский С., Климонт С. — Действие некоторых лекарственных средств на *Histomonas meleagridis* в культуре *in vitro*.

Предметом исследований была гистомонадодобивственная активность *in vitro* 12 лекарственных средств по сравнению с активностью метронидазола. В исследованиях поменили 3 штамма *H. meleagridis* (Hm-L1, Hm-1H, Hm-R), содержащихся в монокультурах *Escherichia coli*, серотип 074:K2, на питательной среде ES с тканевым субстратом Иглы. Из исследованных в общем 13 терапевтиков 5, а именно: сульфаклорпиразин, фермосульфатиазол, метиленовая синь, тиabendазол и тетраимизол не оказывали (в дозе 100 mcg/ml) никакого влияния на переживаемость гистомонад. Из остальных 8 средств наиболее активным кроме метронидазола оказались моненсин и тинидазол, гистомонадодобивственное действие которых отмечилось (до истечения 48 часов), в дозе mcg/ml по сравнению с аналогичным действием метронидазола в дозе 5 mcg/ml. Этакридин, хлорхинальдин, антазолин и медный купорос показали среднюю гистомонадодобивственную активность (поза 25 mcg/ml). В группе 8 активных средств наиболее слабо действовал ласалокцид,

вызывавший омертвление *H. meleagridis* (в течение 48 часов) лишь после дозы 50 мсг/мл.

Ни один из 13 терапевтиков не переносил (в дозе 100 мсг/мл) способности к размножению штамма *E. coli*, что показывало непосредственно вредоносное влияние на простейшего каждого из 8 гистомонадобийственных средств.

Stepkowski S., Klimont S. — The effect of some therapeutic compounds in vitro on *Histomonas meleagridis*.

The examinations were carried out on three strains of *Histomonas meleagridis* (Hm-L1, Hm-IH, Hm-R) maintained on monocultures of *E. coli* (serotype 074:K2)

in the medium ES with Eagle's solution. Out of 13 compounds 5 of them, i.e. sulphachloropirazine, formosulphathiasole, methylenblue, thiabendazole and tetramisole did not effect in a dose of 100 mcg/ml on histomonads. Of the rest eight drugs the most affective apart from metronidazole proved to be Monensin and Tinidazole; they killed the parasite in a dose of 10 mcg/ml compared with 5 mcg/ml of metronidazole. Etacridine, chlorchinaldine, antasoline and copper sulphate were histomonadocidal in a dose of 25 mcg/ml. The least effective was Lasalocide which destroyed *H. meleagridis* only within 48 hrs in a dose of 50 mcg per ml. None of the drugs under study did not inhibit the propagation of *E. coli*, which pointed to the direct action of 8 compounds on the parasite.

BRONISŁAW KOZAKIEWICZ

Badania wpływu wybranych hormonów płciowych na rozwój bąblowców u świń zarazonych eksperymentalnie

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Poznaniu

Bąblowica ludzi i zwierząt wywołana przez *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) stanowi nadal istotny problem sanitarny, jak i zagrożenie związane z ekonomiką produkcji zwierzęcej w wielu krajach świata. Wcześniejsze badania własne (4) wykazały, że *E. granulosus* występuje przede wszystkim u psów na terenach wiejskich. Natomiast postać larwalną tego tasiecmca stwierdza się spośród wszystkich zwierząt kopytnych — głównie u świń. Na przykład w niektórych rejonach Wielkopolski bąblowce stwierdzono u około 35% świń poddawanych ubojowi (4). Przedstawione fakty były czynnikiem stymulującym podjęcie wielokierunkowych badań kompleksowych (4, 5, 6, 7, 9, 10), związanych zwłaszcza z biologią *E. granulosus*, w tym również badania wpływu płci i hormonów płciowych na intensywność inwazji tego pasożyta u psów zarazonych eksperymentalnie. Powyższe badania własne i wsp. (9) między innymi wykazały, że w grupie psów samców — średnia intensywność inwazji *E. granulosus* była ponad 36-krotnie wyższa niż w grupie suk, które były zarazone taką samą dawką protoskoleksów, jak psy samce. Szidat (11) w swoich badaniach między innymi podaje, że hormony płciowe działają na dojrzałe *E. granulosus* u psów, przy czym kastracje tych zwierząt mogą zapobiec echinokokozie.

Zarówno w piśmiennictwie zagranicznym, jak i krajowym brak było dotychczas publikacji na temat wpływu hormonów płciowych na intensywność inwazji bąblowców u świń.

Celem pracy było zbadanie wpływu wybranych hormonów płciowych na rozwój form larwalnych *E. granulosus* u świń, co ma istotne znaczenie dla podjętych badań kompleksowych nad tą zoonozą.

Materiał i metody

Materiałem do badań było 30 świń, samice w wieku około 4 tygodni, pochodzących z gospodarstwa, które na podstawie negatywnych wyników uprzednio przeprowadzonych badań poubojowych świń pochodzą-

cych z tego gospodarstwa uznano za wolne od inwazji *E. granulosus*. Wymienionym prosiętom podano per os w kapsułkach żelatynowych po 2 egzemplarze dojrzałych *E. granulosus*, które pochodziły od psa specjalnie w tym celu zarazonego protoskoleksami bąblowców pobranych z wątrób świń. Zwierzęta podzielono na trzy grupy.

W I grupie 10 świńom podano bezpośrednio po zarażeniu domięśniowo Testosteron propionicum-Polfa, w dawce 75 mg/zwierzę, stosując ją 3 krotnie co drugi dzień; serie tych iniekcji powtarzano 6 krotnie z przerwami jednotygodniowymi.

II grupa świń otrzymała bezpośrednio po zarażeniu, domięśniowo *Oestradiolum benzoicum*-Polfa w dawce 10 mg/zwierzę; dawkę powtarzano jeden raz tygodniowo przez okres 12 tygodni.

III grupa świń nie otrzymała preparatów hormonalnych i stanowiła grupę kontrolną.

Po upływie 7 miesięcy od momentu zarażenia 30 świń doświadczalnych poddano po uboju szczegółowemu badaniu, określając liczbę, wielkość i lokalizację bąblowców. Natomiast przy zastosowaniu metody laboratoryjnej opartej o doświadczenia własne (6) określano ich płodność i żywotność. Bąblowce, w których nie stwierdzono protoskoleksów lub były one obumarłe, zaliczano do sterylnych.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań w 3 grupach, z których każda obejmowała 10 świń przedstawia tab. 1. Wszystkie stwierdzone bąblowce występowały wyłącznie w wątrobie świń zarazonych eksperymentalnie. Na szczególną uwagę zasługują świnię w grupie II, w której zastosowano estradiol. W grupie tej stwierdzono najmniejszą liczbą bąblowców, które były również najmniejszych wymiarów, przy tym w 100% sterylne. Przedstawione wyniki badania świadczą między innymi o tym, że działanie estradiolu nie ogranicza się do swoistego oddziaływania na narząd rozrodczy i gruczoł mlekowy, ale również w sposób wyraźny hamuje rozwój form larwalnych *E. granulosus* w organizmie świń.

Frayha i wsp. (2) wykonując badania eksperymentalne na białych myszach obu płci, zarazonych protoskoleksami *E. granulosus*, wykazali wpływ płci i hormonów płciowych na rozwój bąblowców. U wymienionych białych my-