

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENNIANIE

JACEK JURA

Zwierzęta transgeniczne: metody otrzymywania, problemy i nadzieje

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasienniania Zwierząt,
Instytut Zootechniki, 32-083 Balice k. Krakowa

Biologia kreatywna razem z informatyką, robotyzacją i technologiami eksploracji kosmosu niewątpliwie stanowić będzie podstawowy nurt zainteresowań cywilizacji XXI wieku. Biologia kreatywna, najogólniej ujmując, polega na formowaniu jakościowo nowego organizmu poprzez wycięcie z genomu danego gatunku określonego genu i wstawieniu go do genomu organizmu biorcy z pomocą metod inżynierii genetycznej.

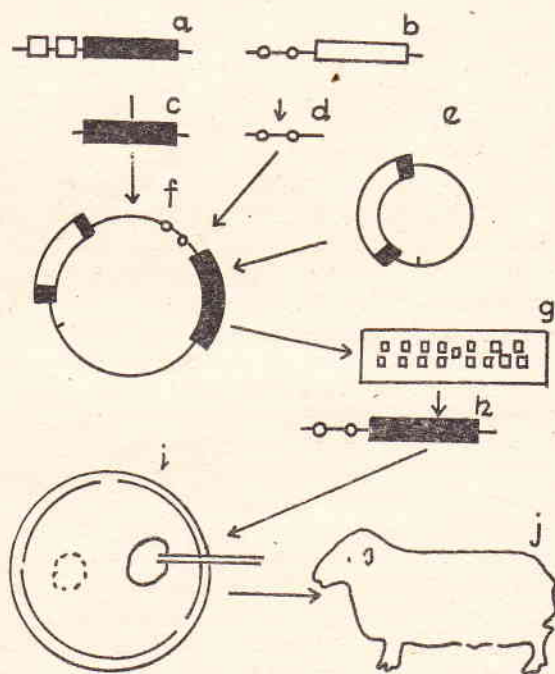
Opracowano już wiele metod przenoszenia różnych genów do mikroorganizmów. Bakterie wyposażone w sztuczne genomy, skonstruowane z pomocą inżynierii genetycznej, umożliwiły produkcję na dużą skalę substancji, po które człowiek mógł dotychczas sięgać tylko w małych ilościach. Pozwoliło to też uzyskać substancje zupełnie nowe.

W przypadku zwierząt konstruowanie nowych genów jest jeszcze w stadium początkowym. Niemniej jednak urodziły się już ssaki, które metodami laboratoryjnymi wzbogaciło o nową informację genetyczną. Rokuje to możliwość uzyskiwania w stosunkowo krótkim czasie efektów, które na drodze tradycyjnych metod krzyżowania i selekcji są niemożliwe. Zwierzęta takie nazwano transgenicznymi. Tego rodzaju zabiegi przekraczają określone przez naturę granice, oddzielające od siebie poszczególne gatunki dlatego, że przeszczepiony gen wystąpił również w komórkach prapłciowych transgenicznych zwierząt i przekazywany jest na potomstwo zgodnie z zasadami segregacji mendelowskiej.

Otrzymywanie zwierząt transgenicznych stało się możliwe dzięki połączeniu metod inżynierii genetycznej, pozwalającej na izolowanie genów i ich klonowanie (powielanie), z metodami embriologii eksperymentalnej, pozwalającej na wprowadzenie izolowanych genów do komórki jajowej lub wczesnego zarodka. Aparat genetyczny w wyniku takiej manipulacji uzyskuje nową informację dziedziczną. Historia tych badań jest krótka, a za przełom należy uznać początek lat osiemdziesiątych. W tych latach udało się wprowadzić obcy DNA, drogą mikroiniekcji, do przedjądrzy zapłodnionych jaj myszy (2, 3, 5, 9, 10, 14, 18, 19, 20, 28, 29). W późniejszych latach przeprowadzono eksperymenty uzyskując transgeniczne potomstwo u królików, owcy, świń i bydła (1, 11, 13, 17, 20). Inżynieria genetyczna

zapowiada produkowanie z pomocą zwierząt transgenicznych farmaceutyków ważnych w medycynie, np. mleka zawierającego ludzkie proteiny (ryc. 1), jak również czynników krwi VIII i IX zapobiegających krwawicze (4), a także mleka z obniżoną ilością laktozy. W artykule zostaną przedstawione podstawowe zagadnienia związane z produkcją zwierząt transgenicznych, zwracając przede wszystkim uwagę na aspekty embriologiczne.

Jedynymi z donioślejszych doświadczeń w zakresie otrzymywania zwierząt transgenicznych były eksperymenty Palmitera i wsp. (18, 19). Eksperyment przeprowadzony w 1982 r. (18) miał szczególne znaczenie, ponieważ posłużono



Ryc. 1. Schemat uzyskiwania transgenicznych zwierząt gospodarskich produkujących farmaceutyki

Objaśnienia: a — sklonowany gen ludzki, b — sklonowany gen owcy, c — wycięty region strukturalny ludzkiego genu, d — odcinek regulatorowy genu owczy, e — plazmid bakteryjny, f — odcinek strukturalny genu ludzkiego połączony z odcinkiem regulatorowym genu owczy wprowadzony do plazmidu bakteryjnego, g — powielanie kombinowanego genu w kolonii bakterii, h — oczyszczanie plazmidów i izolacja kombinowanego genu, i — mikroiniekcja kombinowanego genu do zapłodnionej komórki jajowej owcy, j — przeszczepianie transformowanych zygot do zsynchronizowanych biorczyń.

się genem kombinowanym, to jest składającym się z sekwencji nukleotydów kodujących hormon wzrostu u szczura (GH), w którym wymieniono fragment promotorowy na odcinek promotorowy pochodzący z genu kodującego metalotioneinę (MT) u myszy. Taka kombinacja pozwala na dobre włączenie się obcego genu w genom biorecy (myszy) i czytelną ekspresję. Odpowiedzialny za translację hormonu wzrostu szczura mRNA wyizolowano z przysadek osobników, które pobudzono do intensywnego wydzielania przez wstrzykiwanie glukokortykoidów. Z komórek wątroby myszy, karmionych dietą bogatą w kadm i cynk, wyizolowano mRNA odpowiedzialny za translację białka metabolicznego — metalotioneiny.

Zastosowanie w genie kombinowanym (MT—GH) promotora metalotioneiny miało na celu spowodowanie, poprzez dodatek w diecie metalu kadmu i cynku, ekspresji genu hormonu wzrostu u transformowanych myszy.

W obu przypadkach izolację mRNA przeprowadzono metodą Seeburga (23) na żelu albo poprzez wirowanie (8). Dla sprawdzenia czy wyizolowano prawidłowe mRNA przeprowadzono translację *in vitro* w retikulocytach króliczych (7). W kolejnym etapie, z pomocą odwrotnej transkryptazy i polimerazy I-DNA, na wyizolowanych i zidentyfikowanych mRNA jako matrycach, uzyskano sekwencje c-DNA (od ang. copy DNA) odpowiadające sekwencjom genów kodujących mysia metalotioneinę i hormon wzrostu szczura. Dalsza obróbka polegała na wyodrębnieniu promotorów i ich zamianie. Ten etap wymaga posłużenia się odcinkami DNA tworzącymi tzw. bibliotekę genów (8, 18, 19, 21, 24, 25, 27). Oczyszczony i sklonowany kombinowany gen wprowadzono do męskich przedjadrzy zapłodnionych komórek jajowych myszy, w wielu kopiach.

Transformowane jaja przeszczepiono biorecyjom odpowiednio przygotowanym do podjęcia ciąży, poprzez podawanie hormonów. U części uzyskanego potomstwa stwierdzono w tkankach obecność genu hormonu wzrostu szczura, a we krwi pojawił się sam hormon, tak więc obcy gen uległ ekspresji u transgenicznym myszy. Osobniki te rosły i przybierały na wadze szybciej niż myszy kontrolne, niektóre były prawie dwa razy cięższe i większe. Należy podkreślić, że efekt ten był wywołany obecnością w komórkach myszy wielu kopii genu hormonu wzrostu, a nie jedynie skutkiem wprowadzenia do genomu myszy, zwierzęcia mniejszego od szczura, genu hormonu wzrostu szczura.

W kolejnych latach, po eksperymencie Palmera i wsp. do genomu myszy wprowadzano inne obce geny: transferyny (białko wiążące żelazo i obecne we krwi wszystkich kręgowców), jedną z immunoglobulin, czy hormon wzrostu człowieka (8, 14, 29). Wiele komórek jajowych o zmodyfikowanych genomach ginie w trakcie manipulacji, lub krótko po zabiegu. Ostatnio

więc technika konstrukcji zwierząt transgenicznych skupia się na opanowaniu skutecznego metody iniekcji obcych genów do zapłodnionych komórek jajowych.

Szereg prac, zwłaszcza wykonanych ostatnio (1, 3, 9, 11, 13, 17, 20) wskazuje, że uzyskiwanie transgenicznego potomstwa jest wydajniejsze jeżeli obce geny wprowadzono do męskiego, a nie żeńskiego przedjadrza. Wstępną, ważną czynnością, jest więc zlokalizowanie w komórce jajowej przedjadrzy i ich rozrozmieszczenie. W przypadku zygot myszy, lokalizacja przedjadrzy, przy posługiwaniu się mikroskopem wyposażonym w urządzenie Nomarskiego, nie przedstawia większych trudności. Przedjadrza są także dobrze widoczne w zapłodnionych komórkach jajowych krowka (11). Natomiast u takich zwierząt gospodarskich, jak owce czy kozy lokalizacja przedjadrzy, ze względu na specyficzną budowę ooplazmy, sprawia pewne trudności. W przypadku owcy można zlokalizować przedjadrza posługując się mikroskopem z urządzeniem Nomarskiego tylko u około 80% zapłodnionych jaj. Zespół Hammera (11) poprawił efektywność wizualizacji posługując się metodą fluorescencji. Metoda polega na potraktowaniu komórek jajowych fluorochromem 33252 i wymaga jednoczesnego krótkotrwałego naswietlenia zygot promieniami ultrafioletowymi. Przy takim zabiegu lepiej uwidaczniają się przedjadrza, ale naswietlanie wywołuje efekt niszczący, zygoty oomierają w większym procencie aniżeli te, których nie nasświetlano. Inną metodą, którą zastosował Nancarrow i wsp. (16), jest wirowanie zygot owczych przed iniekcją, ale poprawa wizualizacji w tej metodzie jest, praktycznie biorąc, niewielka. W przypadku owcy problem jest więc nadal otwarty.

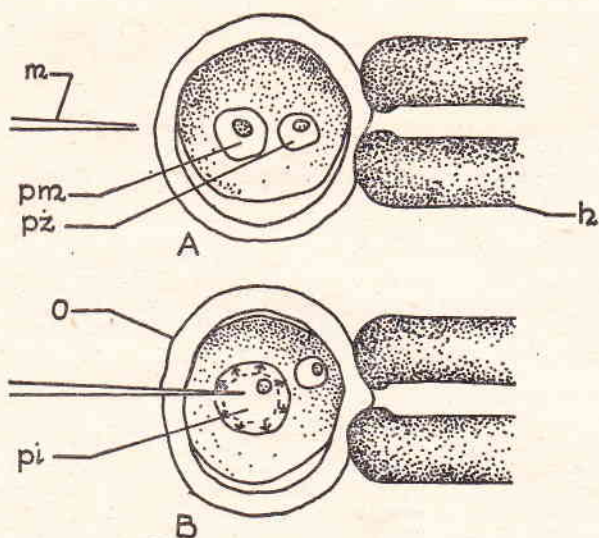
W zygotach świni, ze względu na komórki granulozy w ooplazmie liczne i nieprzejryste, przedjadrza są niewidoczne. W tym przypadku wirowanie okazało się pomocne. Stosuje się wirowanie przez 3 minuty z użyciem siły 15 000 g. Taki zabieg powoduje przesunięcie ciemnej warstwy granulozy na jeden z biegunów, umożliwiając zlokalizowanie przedjadrzy pod mikroskopem (1, 30). Podobny zabieg stosuje się w przypadku zygot bydła. Ponadto okazało się, że u tych zwierząt zastosowanie fluorescencji z użyciem światła ultrafioletowego nie wywołuje szkodliwego wpływu na zygoty. Jako odczynnik można stosować 4'-6'-diamidino-2, fenoloindol (15) albo fluorochrom Hoescht 33342 (6).

Inne problemy stwarza sama iniekcja DNA. Mikropipeta z płynem zawierającym kopie DNA musi przebić błonę komórkową jaja, przeniknąć ooplazmę i musi dotrzeć do przedjadrza. Musi więc być odpowiednio wykonana. Mikropipety wykonuje się ze szkła o ściśle określonych parametrach. Wyciąga się je więc z kapilar, które zawierają wewnątrz na ścianie mikrofilament. Kąt nachylenia ścian mikropipety, powodujący zwiężanie się jej światła w stosunku do długiej

osi, nie może przekraczać 5° . Takie zwięźenie ułatwia przebicie błony komórkowej, przejście przez ooplazmę i powoduje niewielkie uszkodzenia. Odpowiednią średnicę kapilar uzyskuje się na wyciągarce.

Roztwór zawierający kopie odcinków DNA, sporządzony w oparciu o bufor lub wodę destylowaną, poddaje się wirowaniu przed wprowadzeniem do mikropipety, celem osadzenia kopii DNA. Pipetę wypełnia się zawiesiną, o największym stężeniu kopii DNA, do około 3/4 jej długości, resztę światła wypełnia się płynem Fluorinett TC 77, który jest nietoksyczny i nie miesza się z wodą. Ma to na celu zapobiegnięcie parowaniu. Tak przygotowaną mikropipetę z zawiesiną można przechowywać przez około 2 godziny w temperaturze 4°C . Zatopiony koniec mikropipety, po stronie zawiesiny, obłamuje się przed samym zabiegiem.

Dla wykonania prawidłowej iniekcji niezbędne są dwa mikromanipulatory z dwoma niezależnymi podjednostkami. Na jednej podjednostce umocowiuje się mikropipetę z DNA, druga podtrzymuje zygotę, zanurzoną w specjalnym środowisku płynnym. Do przedjądra wprowadza się około 2 pl zawiesiny kopii odcinków DNA. Przy prawidłowo wykonanej iniekcji objętość przedjądra powinna się zwiększyć o około 50%, co jest dobrze widoczne pod mikroskopem (ryc. 2). Zygoty, po zabiegu, pozostawia się przez około 1–2 godzin w płynie do hodowli, sprawdzając prawidłowość zabiegu i następnie przenosi do jajowodów zsynchronizowanych biorczyń.



Ryc. 2. Schemat mikroiiniekcji DNA do męskiego przedjądra zapłodnionej komórki jajowej

Objaśnienia: A – zygota przed mikroiiniekcją, B – zygota w trakcie mikroiiniekcji, m – pipeta przytrzymująca zygotę, pm – mikropipeta iniekcyjna wypełniona buforem z DNA, o – osłona przejrzysta, pi – przedjądro męskie, pi – przedjądro żeńskie, strzałki – wskazują na zwiększenie objętości przedjądra w trakcie wprowadzania do niego DNA w buforze.

Przeprowadzanie mikroiiniekcji DNA do cytoplazmy komórki jajowej, zamiast do przedjądra, jest znacznie łatwiejsze, ale poziom integracji obcych genów z genomem biorcy jest w tym przypadku bardzo niski. Efektywność integracji, w przypadku wprowadzenia DNA do przedjądra, wynosi od 20–30% (3). Bardzo niski jest poziom integracji w przypadku iniekcji obcego DNA do komórek zarodka znajdujących się w stadium dwu- lub czterekomórkowym (31).

Istotnym zagadnieniem jest objętość roztworu i stężenie w nim kopii DNA. Przy przekroczeniu określonych wartości roztwór działa na zygotę toksycznie. Brinster i wsp. (3) ustalili, że wartości te powinny wynosić 1 ng/ul buforu. Prawidłowy skład buforu dla zygot mysich powinien zawierać: 10 M Tris-HCl i 0,25 M EDTA pH 7,5 (31). Najlepszym okazał się bufor, w którym koncentracja EDTA wynosi 0,1 mM, a nie przekracza 0,3 mM EDTA (31).

Obce geny wprowadza się do zygot jako liniowe odcinki DNA z końcami lepkimi lub tępymi albo jako geny wiązane do plazmidów czy wirusów (12). Najlepiej integrują się z genomem kopie liniowe obcego DNA z lepkimi końcami i efektywność wynosi tu 24–31%. Liniowe kopie DNA z tępymi końcami, albo DNA zespiralizowane (supercoiled) integruje się co najwyżej w 6% (3). Długość kopii DNA, w granicach 0,1–20 kb, nie ma wpływu na efekt integracji (3).

Omawiając technikę i efektywność iniekcji należy podkreślić, że nie dysponuje się jeszcze żadną metodą pozwalającą na kontrolę liczby kopii obcego DNA podlegającego integracji z genomem transformowanej zygoty. Liczba kopii ulegająca wiązaniu się jest różna u różnych osobników tego samego gatunku i waha się od jednej (niezwykle rzadko) do kilkuset.

Wszystkie kopie są najczęściej zblokowane w jednym miejscu chromosomu, co oczywiście nie jest bez znaczenia dla ekspresji wprowadzonego genu. Należy przypomnieć, że w doświadczeniach Palmitera i wsp. (18) sztucznie skonstruowany gen hormonu wzrostu szczura podlegał ekspresji u myszy transgenicznych głównie w wątrobie, gdzie normalnie hormon wzrostu nie jest produkowany. Taka fizjologicznie nie kontrolowana synteza hormonu w nietypowej tkance powoduje intensywniejszy wzrost, ale wywołuje również negatywne skutki, które dopiero zaczynamy poznawać. Może na przykład spowodować obniżenie lub wywołanie całkowitej bezpłodności. Wprowadzenie obcych genów wywołuje także niekiedy mutacje wpływające na prawidłowość przebiegu procesów rozwoju zarodkowego, aż do letalności.

Jak na razie, doświadczenia z iniekcją genu hormonu wzrostu powtórzone na królikach, świnach, owcach czy kozach wykazały wprowadzenie ekspresję obcego genu u tych zwierząt, ale nie stwierdzono zwiększonego wzrostu. Biologicznie

kontrolowane efekty będzie można otrzymywać, jeżeli będzie można kontrolować liczbę i miejsce włączania się kopii obcego genu do genomu zygoty biorocy. Uczyniono już pewien postęp u zwierząt niższych, zwłaszcza u owadów, jak u muszki owocowej (22, 25). Budzi to nadzieję, że w przyszłości problemy te zostaną rozwiązane i u ssaków.

Wizja programowania produkcji zwierzęcej jest bardzo atrakcyjna i prace nad transgenicznymi zwierzętami będą podejmowane w coraz to liczniejszych ośrodkach. Intensywny wzrost nie jest oczywiście jedyną ważną cechą użytkową u zwierząt gospodarskich i dalsze badania pójdą na pewno w wielu innych kierunkach. Badania nad transgenicznymi zwierzętami mają także szczególne znaczenie poznawcze, ponieważ dają możliwości analizowania regulacji funkcji genomu u ssaków, która ciągle jest tajemnicą.

Piśmiennictwo

1. Brem G., Brenig B., Kriusslich H., Müller M., Springmann K., Winnacker E. L.: 11th Int. Congr. Anim. Reprod. Ins. Dublin 4, 467, 1988.
2. Brinster R. L., Chen H. Y., Trumbauer M., Seneor A. W., Warren R., Palmiter R. D.: Cell 27, 223, 1981.
3. Brinster R. L., Chen H. Y., Trumbauer M., Yagle M. K., Palmiter R. D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4438, 1985.
4. Clark A. J., Simons P., Wilmut I., Lothe R.: Trends Biotech. 5, 20, 1987.
5. Constantini F., Lacy E.: Nature 294, 92, 1981.
6. Crister E. S., Ball G. D., O'Brien M. J., First N. L.: Biol. Reprod. (Suppl. 1) 28, 140, 1983.
7. Durnan D. M., Perrin F., Gannon F., Palmiter R. D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6511, 1980.

8. Frankham R., Gillings M. R.: Proc. FAO/UNEP Expert Panel Meeting Rome 44/2, s. 89, 1984.
9. Gordon J. W., Ruddle F. H.: Science 214, 1244, 1981.
10. Gordon J. W., Scangos G. A., Plotkin D. J., Barbosa J. A., Ruddle F. H.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7380, 1980.
11. Hammer R. E., Pursel V. G., Rexroad C. E., Wall R. J., Bolt D. J., Ebert M. K., Palmiter R. D., Brinster R. L.: Nature 315, 630, 1985.
12. Kahn M., Koller R., Thomas C., Figurski D., Meyer R., Remaut E., Holsinki D. R.: J. Mol. Enzymol. 68, 268, 1979.
13. McKnight G. S., Hammer R. E., Kunzel E. A., Brinster R. L.: Cell 34, 335, 1983.
14. Kraemer D., Minhas B., Capehart J.: Biol. Reprod. 31, 221, 1985.
15. Minhas B. S., Capehart J. S., Bowen M. J., Womach J. E., McGrady J. D., Harms P. G., Wagner T. E., Kraemer D. C.: Biol. Reprod. 30, 687, 1984.
16. Nancarrow C. D., Murray J. D., Boland M. P., Hazelton I. G., Sutton R.: Theriogenology 21, 248, 1984.
17. Nancarrow C. D., Shanahan C. M., Byrne C., Marshall J. I. A., Murray J. P., Hazelton I. G., Rigby N. W., Townrow C. T., Ward K. A.: 11th Congr. Anim. Reprod. Ins. Dublin 4, 467, 1988.
18. Palmiter R. D., Brinster R. L., Hammer R. E., Trumbauer M. E., Rosenfeld M. G., Birnberg N. V., Evans R. M.: Nature 300, 611, 1982.
19. Palmiter R. D., Chen H. Y., Brinster R. L.: Cell 34, 37, 1983.
20. Pursel V. G., Miller K. F., Pinkert C. A., Palmiter R. D., Brinster R. L.: 11th Int. Congr. Anim. Reprod. Ins. Dublin 4, 480, 1988.
21. Roberts R. J.: Nuc. Acids Res. 11, 135, 1983.
22. Scholnick S. B., Morgan B. A., Hirsh J.: Cell 34, 37, 1983.
23. Seeburg P. H., Shine J., Martial J. A., Baxter J. D., Goodman H. M.: Nature 270, 486, 1977.
24. Smith G. E., Summers M. D.: Anal. Biochem. 109, 123, 1980.
25. Southern E.: Met. Enzymol. 68, 152, 1979.
26. Spradling A. C., Rubin G. M.: Cell 34, 47, 1983.
27. Taub F., Thomson E. B.: Anal. Biochem. 126, 222, 1982.
28. Wagner T. E., Hoppe P. C., Jollich J. D., Scholl D. R., Hodinka R. L., Gault J. B.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6376, 1981.
29. Wagner E. F., Steward T. A., Mintz B.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1981.
30. Wall R. J., Pursel V. G., Hammer R. E., Brinster R. L.: Biol. Reprod. 32, 645, 1985.
31. Wilmut I., Simons P.: Inst. Animal Ph. Edinburg 1988, dane niepubl.

Adres autora: mgr inż. Jacek Jura, ul. N. Krupskiej 12 m. 4, 31-559 Kraków

FROST A. J., OBOYLE D., SAMUEL J. L.: Izolowanie drobnoustrojów z rodzaju *Salmonella* od cieląt opasowych utrzymywanych w różnych warunkach przed ubojem. (The isolation of *Salmonella* spp. from feedlot cattle managed under different conditions before slaughter). Aust. vet. J. 65, 224—225, 1988 (7)

Badania przeprowadzono na cielętach w trzech grupach, każda licząca od 70 do 100 zwierząt. W grupie 1 uboju dokonano po 2 dniach po zakupie, w grupie 2 cielęta opasano przez 18 a w grupie 3 przez 80 dni. Badaniom bakteriologicznym w kierunku obecności drobnoustrojów z rodzaju *Salmonella* poddano treści żwacza i krezkowe węzły chłonne. W grupie 1 wyosobniono trzy szczepy salmonelli ze żwacza i 6 z krezkowych węzłów chłonnych, w grupie 2 wyizolowano 8 szczepów salmonelli ze żwacza i 15 z krezkowych węzłów chłonnych. Natomiast w grupie 3 nie izolowano ze żwacza i krezkowych węzłów chłonnych drobnoustrojów z rodzaju *Salmonella*. Wyosobnione szczepy zidentyfikowano jako *S. anatun*, *S. bredney*, *S. bovis-morbificans*, *S. eimsbuttel*, *S. litchfield*, *S. newport*, *S. anderstepoort*, *S. oranienburg* i *S. typhimurium*. Stężenie salmonelli w krezkowych węzłach chłonnych wynosiło ponad $1 \times 10^4/g$.

G.

KLEIN W. R., FIRTH E. C.: Częstotliwość zakażeń w czystych metodach chirurgicznych przy stosowaniu osłony antybiotykowej i bez osłony antybiotykowej. (Infection rates in clean surgical procedures with and without prophylactic antibiotics). Vet. Rec. 123, 542—543, 1988 (21)

Badaniami objęto 100 cieląt z nieskomplikowaną przepukliną pępkową. Częstotliwość wystąpienia zakażeń pooperacyjnych i nawrotów przepukliny porównano u cieląt u których nie stosowano osłony antybiotykowej oraz u cieląt u których zastosowano na 30

min. przed przecięciem powłok ciała dożylną iniekcję ampicyliny sodowej (10 mg/kg) oraz bezpośrednio po zabiegu i po 12 godz. domięśniową iniekcję siarczanu dihydrosteptomycyny (25 mg/kg) i penicyliny prokainowej G (15000 E/kg). Wśród 60 cieląt operowanych bez osłony antybiotyków i 30 operowanych pod osłoną antybiotykową tylko jeden raz, zakażenia pooperacyjne nie występowały i tylko w jednym przypadku wystąpił nawrót przepukliny. Natomiast wśród 10 cieląt operowanych dwukrotnie (7 bez osłony antybiotyków a 3 pod osłoną) w grupie cieląt operowanych bez osłony antybiotykowej w 2 przypadkach wystąpiły pooperacyjne powikłania bakteryjne i w jednym przypadku nawrót przepukliny.

G.

VANPARIJS O., HERMANS L., MARSBOOM R.: Skuteczność flubendazole w stosunku do nicieni żołądkowo-jelitowych i płucnych prosiąt. (Efficacy of flubendazole against gastrointestinal and lung nematodes in pigs). Vet. Rec. 123, 337—339, 1988 (13)

Przeprowadzono trzy serie obserwacji na świniach w różnym wieku zarażonych na drodze naturalnej lub sztucznie nicieniami żołądkowo-jelitowymi lub płucnymi, u których zastosowano flubendazole (Fluvermal). Zwierzęta zakażono *Metastrongylus apri*, *Ascaris suum*, *Oesophagostomum dentatum* lub *Hyoststrongylus rubidus*. W chowie wielkostadnym uzyskano 100% skuteczności w stosunku do czterech badanych gatunków nicieni stosując flubendazole jako dodatek do paszy w dawce 30 ppm przez okres 10 dni. W małych hodowlach stosując flubendazole jako dodatek do paszy w dawce 30 ppm przez okres 10 dni. W małych hodowlach uzyskano 100% skuteczności po jednorazowym zastosowaniu flubendazole w dawce 5 mg/kg masy ciała z niewielką ilością karmy. W żadnym przypadku nie obserwowano działania ubocznego preparatu.

G.