

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1.Tytuł projektu: Badania immunogenności wybranych mezofilnych wykazujących zdolność ruchu bakterii *Aeromonas* reprezentujących różne serogrupy, na pstrągi tęczowe i karpie

2.Czas trwania projektu: 02.01.2021 – 30.12.2023

3.Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): *Aeromonas* / serotypy / surowice / króliki / ryby
Aeromonas / serotypes / antisera / rabbits / fish

4.Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) **E**

A. Badania podstawowe

B. Badania translacyjne lub stosowane

C. Badania mające na celu zachowanie gatunku

D. Badania z zakresu medycyny sądowej

E. Badania zapewniające poprawę dobrostanu zwierząt lub warunków chowu lub hodowli zwierząt gospodarskich

F. Badania w celu opracowania i produkcji produktów leczniczych, środków spożywczych, pasz lub innych substancji lub produktów, lub badań ich jakości, skuteczności lub bezpieczeństwa stosowania

G. Badania w celu ochrony środowiska naturalnego

H. Badania w celu kształcenia na poziomie szkolnictwa wyższego lub szkolenia w celu nabycia lub doskonalenia kompetencji zawodowych

5. OPIS PLANOWANEGO DOŚWIADCZENIA

Należy określić cel naukowy lub edukacyjny doświadczenia, w tym przewidywane szkody, jakie może ono spowodować u wykorzystywanych zwierząt, i korzyści, jakie przyniesie ono dla rozwoju nauki i dydaktyki. Maksymalnie 250 słów, tekst musi być zrozumiały dla niespecjalisty.

Bakterie *Aeromonas* wywołują poważne zaburzenia zdrowotne ryb. Przebieg choroby związany jest z właściwościami bakterii, w tym ich serogrupą. Zwalczanie choroby obecnie polega na antybiotykoterapii, która staje się obecnie mało skuteczna. Dzięki zaplanowanym badaniom możliwe będą badania nad opracowaniem szczepionki zwalczającej infekcje *Aeromonas*. W tym celu analizie zostanie poddane zróżnicowanie strukturalne komponentów komórkowych bakterii *Aeromonas*, w zależności od ich serotypu, a następnie ich wpływu na zdolność pobudzenia układu odpornościowego ryb. Do wykonania tych badań kluczowe jest użycie poliklonalnych surowic odpornościowych, które pozyskane będą od królików.

Korzyści uzyskane z przeprowadzonych doświadczeń wpłyną na ochronę zdrowia ryb i ograniczą straty w ich hodowli.

W celu pozyskania swoistych surowic odpornościowych króliki, po 30-dniowej aklimatyzacji, poddane zostaną immunizacji bakteriami *Aeromonas* należącymi do różnych serotypów. Dzięki temu pozyskane surowice będą unikatowe, specyficzne dla danego serotypu *Aeromonas*. Tego typu wysoce specyficzne surowice nie są dostępne komercyjnie. Szczepienia wykonywane będą w odstępach 6-dniowych. Po miejscowym znieczuleniu, z żyły brzożnej ucha królika pobrana zostanie

krew, która posłuży do określenia miana przeciwciał. Po uzyskaniu odpowiednich wartości, króliki zostaną znieczulone, a następnie skrwawione, celem pobrania maksymalnej ilości krwi. Natychmiast po tym zabiegu nastąpi uśmiercenie zwierząt. Ryby, po 14-dniowej aklimatyzacji zostaną zaszczone w kąpielach różnymi antygenami, podanymi w różnych dawkach. Kontrolę stanowią będą ryby nie immunizowane. Po 2 miesiącach od szczepienia, po wcześniejszym znieczuleniu ryb, pobrana zostanie krew celem oznaczenia miana przeciwciał. Po farmakologicznej eutanazji pobrane zostaną również tkanki i narządy do dalszych badań.

Kategoria procedury doświadczalnej reprezentuje [PE40] Ochrona środowiska naturalnego w interesie zdrowia i dobrostanu ludzi i zwierząt.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

20 Królik europejski rasa Nowozeland (*Oryctolagus cuniculus*)

500 pstrąg tęczowy (*Oncorhynchus mykiss*)

500 karp pospolity (*Cyprinus carpio*)

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazach danych PubMed, Scopus oraz Web of Science (JCR).

Wykorzystałam następujące słowa kluczowe: *Aeromonas*/ serotypes / antisera / immunization / rabbits / rainbow trout / common carp / vaccine

Przeglądałam ponadto książki dotyczące zagadnień związanych z etiologią schorzeń u ryb. Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzam, że:

A. Nagromadzony materiał badawczy wskazuje na uzasadnione wykorzystanie gatunku królik, pstrąg tęczowy, karp w tym doświadczeniu.

Opracowanie skutecznej szczepionki polega na przeprowadzeniu badań nad kluczowym jej składnikiem czyli antygenem. W celu konieczne jest użycie swoistych poliklonalnych surowic odpornościowych, które nie są dostępne komercyjnie. Niezbędne jest więc przeprowadzenie stymulacji układu immunologicznego królików, aby surowice te pozyskać z krwi. Użycie królików w doświadczeniu przeanalizowano w zestawieniu do innych zwierząt zdolnych do wytworzenia swoistych surowic poliklonalnych, tj. kóz i owiec. Z uwagi na wielkość tych zwierząt, a także aspekty ekonomiczno-logistyczne, zdecydowano się na użycie królików do przeprowadzenia doświadczenia.

Sprawdzenie skuteczności opracowanej szczepionki możliwe jest tylko po przeprowadzeniu badań na docelowym gatunku zwierząt. Dlatego w doświadczeniu użyto karpia i pstrągów jako dwóch gatunków, u których produkt ten będzie stosowany.

¹ Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

B. Brak jest danych literaturowych dotyczących badań nad różnymi komponentami komórki bakteryjnej, które mogą być wykorzystane w przygotowaniu efektywnych szczepionek przeciwko bakteriom *Aeromonas* u ryb.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

A. zbadanie wpływu różnych składowych komórki bakteryjnej *Aeromonas* należących do różnych serotypów, na stymulację układu immunologicznego ryb

B. wprowadzenie profilaktyki zakażeń mezofilnymi bakteriami *Aeromonas*, przez co ograniczone zostaną straty w chowie i hodowli pstrągów i karpia w Polsce.

Proponowane doświadczenie zostało zaprojektowane z myślą o efektywnej realizacji zasad zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia (tzw. zasada 3R – replacement, reduction and refinement).

1. Udoskonalanie

Zastosowane metody zostały wybrane tak, aby ograniczyć do minimum albo wyeliminować ból, cierpienie, dystres. W czasie wykonywania procedur zwierzęta będą przebywały pod opieką doświadczonego personelu, w ściśle określonych kontrolowanych warunkach w zakresie temperatury otoczenia, temperatury wody, natlenienia wody, oświetlenia, minimalnego poziomu hałasu oraz wzbogacenia środowiska. W ramach udoskonalenia procedur dla zwierząt (zarówno króliki jak i ryby), zapewniony zostanie fizyczny oraz wizualny kontakt między zwierzęciem, natomiast kontakt z eksperymentatorem zostanie ograniczony do niezbędnego minimum. Czynności związane zarówno z przenoszeniem królików i pobieraniem od nich krwi, jak i odłowem oraz przenoszeniem ryb między pojemnikami, w tym również pobranie krwi, będą wykonywane w możliwie najkrótszym czasie. Ma to zminimalizować dystres, dyskomfort i niepokój, których doświadczają zwierzęta w czasie wykonywania tych zabiegów. Pobranie krwi od królików celem ich skrwawienia, zostaną wykonane w znieczuleniu, po czym natychmiast króliki zostaną poddane eutanazji przez dyslokację kręgów szyjnych. Pobrania krwi od ryb zostaną wykonane w znieczuleniu, po czym ryby natychmiast zostaną poddane eutanazji przez przedawkowanie środka farmakologicznego. Zwierzęta będą znajdowały się pod stałą kontrolą lekarza weterynarii

2. Ograniczenie

Liczba zwierząt w doświadczeniu została ograniczona do najmniejszej, jaka jest możliwa dla uzyskania spójnych i powtarzalnych wyników oraz możliwości przeprowadzenia wiarygodnej analizy statystycznej. Krew pozyskana od królików posłuży do uzyskania takiej ilości surowicy, która nie będzie wymagała przeprowadzenia tego typu doświadczeń przez dłuższy czas. Tkanki i narządy pobrane i zabezpieczone ryb, a także surowica królicza wykorzystane zostaną w innych doświadczeniach.

Celem ochrony ryb przed zachorowaniem stosowane są różne preparaty immunologiczne, w tym szczepionki. Na podstawie przeglądu literatury wybrano najbardziej odpowiednie stężenia zawiesiny bakterii, w których zostaną wykąpane ryby. Prowadzony przegląd literatury przyczynił się zatem do wybrania najczęściej stosowanego stężenia preparatu i dzięki temu do ograniczenia liczby zwierząt użytych w doświadczeniu. Ponadto, w każdym z punktów planowanego doświadczenia użyta zostanie odpowiednia, statystycznie istotna liczba ryb, umożliwiającą uzyskanie rzetelnych wyników.

3. Zastąpienie

Planowane badania wymagają wnioskowania w odniesieniu do całego organizmu, stąd nie można w nich zastosować metody wykluczającej wykorzystanie zwierząt doświadczalnych. Nie można zastosować metody badawczej zapewniającej osiągnięcie celu niniejszego doświadczenia bez

wykorzystania zwierząt doświadczalnych. Jedynie przeprowadzenie zaplanowanych badań na zwierzętach pozwoli na wyprodukowanie swoistych przeciwciał odpornościowych, zarówno przez króliki, jak i ryby. Dzięki tym badaniom możliwe będzie poznanie i określenie wybranych komórkowych elementów bakterii *Aeromonas* należących do różnych serotypów i zbadanie ich wpływu na pobudzenie układu odpornościowego ryb czego efektem końcowym będzie opracowanie szczepionki. Przeprowadzenie zaplanowanych badań nie jest możliwe przy zastosowaniu procedur *in vitro*, m. in. hodowli tkankowych. W opracowanym projekcie doświadczenia, racjonalne i praktyczne jest wykorzystanie narządów i tkanek zwierząt. Pozyskane surowice odpornościowe od królików posłużą do przeprowadzenia wielu innych analiz laboratoryjnych, zapewniając materiał do badań na wiele lat.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy
- ☒ NIE

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.