

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Badanie mechanizmu działania szczepionki przeciw wirusowi KHV oraz beta defensyn karpia jako adjuwantów w modelu infekcyjnym karpia wirusem KHV.

2. Czas trwania projektu: 12 miesięcy

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): Koi herpesvirus, szczepienie, odporność wrodzona, beta defensyny, odpowiedź immunologiczna

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych): A. Badania podstawowe

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.

W chowie karpia choroba wywołana zakażeniem herpeswirusem koi (koi herpesvirus, KHV,) powoduje spustoszenie (śmiertelność powyżej 90% zwierząt) w populacjach hodowlanych i naturalnych karpia. Choroba wywoływana przez wirus KHV może silnie wpływać na dobrostan zwierząt. Karp jest podstawowym gatunkiem produkowanym w Polsce i z tego względu powinien być chroniony przed zakażeniem tym wirusem. W krajach, w których występuje wirus szczepienie jest najlepszą strategią, którą można zastosować by ograniczyć straty wywołane wirusem. Wytworzenie szczepionki przeciwko herpeswirusom rybnym jest zadaniem bardzo skomplikowanym dlatego w proponowanych badaniach zastosowany zostanie atenuowany wirus KHV, który we wstępnych badaniach przeprowadzonych w Niemczech zapewniał wysoką odporność na zakażenie wirusem.

Głównym celem projektu jest sprawdzenie mechanizmu działania szczepionki przeciwko KHV oraz odpowiedzi immunologicznej (wrodzonej i nabytej) na szczepionkę i zakażenie KHV. Zbadanie zostanie również zastosowanie nowoczesnych adjuwantów (w postaci syntetycznych beta defensyn karpia), które mogą wspomóc odpowiedź immunologiczną szczepionych ryb.

Zbadany zostanie mechanizm w jaki działa szczepionka, w jakim stopniu atenuowany wirus rozprzestrzenia się w organizmie ryb szczepionych. W jakim stopniu chroni on ryby przeciwko wysoce zjadliwemu polskiemu izolatowi KHV. Planowane badanie będzie pierwszym na świecie, które badać będzie odpowiedź immunologiczną wrodzoną i nabytą oraz śledzenie wirusów KHV szczepionkowego

i terenowego w tkankach ryb zaszczipionych atenuowanym wirusem KHV.

Proponowane badania są niezbędnym krokiem do lepszej ochrony karpia hodowlanych przed infekcjami wirusowymi. Strategia przeciwdziałaniu rozprzestrzenianiu się chorób z użyciem szczepionek może być bardzo potrzebna w akwakulturze, gdzie choroby wirusowe wpływają na znaczne obniżenie produkcji oraz obniżenie dobrostanu zwierząt.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Gatunek: Karp (*Cyprinus carpio*) Szczep: PS: 420 szt.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PubMed, ScienceDirect, Scous, Web of Science, Google Scholar.

Wykorzystano słowa kluczowe: szczepienie na KHV, odpowiedź immunologiczna na szczepienie przeciw KHV, beta-defensyny, adjuwanty.

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam, że nie istnieją dane na temat wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej na wysoce skuteczną szczepionkę przeciwko KHV. Nie badano ekspresji genów kodujących wybrane białka szlaku IFN typu I, limfocytów B i T podczas szczepienia karpia przeciwko KHV. Brak jest danych na temat użycia syntetycznych beta-defensyn jako adjuwantów u ryb.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

- A) Rozwinięcie teoretyczne/poznawczej wiedzy w kierunku szczepienia i immunologii u ryb.
- B) Zbadanie mechanizmu obronnego zapewniającego przeżycie zakażenia KHV.
- C) Rozwój nowoczesnych adjuwantów stosowanych na błonę śluzową ryb.

W proponowanym wniosku uwzględniono zasadę 3 R:

Replacement - zasada zastąpienia będzie spełniona poprzez następujące działania:

Część badań nad aktywnością beta defensyn została wykonana *in vitro*. Dzięki nim wytypowano ze mix wszystkich trzech defensyn będzie użyty w badaniach *in vivo*. Do badań wybrano gatunek kręgowca o możliwie najniższym poziomie rozwoju oraz zdolności odczuwania bólu i cierpienia. Nie ma możliwości całkowitego zastąpienia żywych zwierząt innym modelem badawczym, ponieważ badany wirus infekuje ryby.

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

Reduction - zasada zmniejszania/ograniczenia będzie spełniona poprzez następujące działania:

Na podstawie wcześniejszych badań przeprowadzonych w Niemczech wybrano tylko jednego wirusa używanego do szczepienia poza tym zredukowano liczbę adiuwantów przez użycie zmieszanych beta defensyn 1, 2 i 3 karpia. Liczba zwierząt w grupach zaplanowanych do badań została zredukowana do niezbędnego minimum umożliwiającego uzyskanie rzetelnych wyników badań. Wynika ona z dotychczasowego doświadczenia badaczy oraz wyliczeń statystycznych opartych na analizie wielkości próby z wykorzystaniem testu analizy dwuczynnikowej wariancji ANOVA) i dalsze ograniczenia liczebności osobników w grupie i liczby grup uniemożliwiłoby otrzymanie wiarygodnych wyników, gdyż wpływ cech osobniczych na zakażenie wirusem może być znaczący, co zostało uwzględnione w czasie projektowania doświadczenia. Dalsze ograniczanie liczby zwierząt doprowadziłoby do niepowodzenia doświadczenia, a tym samym naraziłoby zwierzęta na niepotrzebne i bezzasadne ich użycie.

Konstrukcja doświadczenia pozwala na ograniczenie do niezbędnego minimum ilości zwierząt.

Wykonawcy posiadają duże, udokumentowane publikacjami, doświadczenie w technikach i metodach doświadczalnych co powoduje, że każde z zaplanowanych w doświadczeniu zwierząt zostanie w pełni wykorzystane do uzyskania wiarygodnych wyników. Poza tym tkanki pobrane i zabezpieczone od zwierząt w doświadczeniu posłużą najprawdopodobniej w kilku kolejnych badaniach naukowych, które z tego powodu nie będą już wymagały dalszego użycia zwierząt.

Refinement - zasada udoskonalenia będzie spełniona poprzez następujące działania:

W czasie przeprowadzania eksperymentu ryby będą przetrzymywane w kontrolowanych warunkach, które znacznie przewyższają minimalne normy hodowli dla tego gatunku.

Opisane w doświadczeniu czynności są standardowymi czynnościami wykonywanymi w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie. Wykonujący mają duże doświadczenie w badaniach z wykorzystaniem ryb w tym w czynnościach opisanych we wniosku. Dzięki wieloletniej praktyce potrafią przeprowadzać opisane procedury w sposób bardzo sprawny oraz przy minimalnym bólu oraz stresie.

Planowane jest zbadanie przybliżonej śmiertelności a nie faktycznej śmiertelności kumulatywnej dzięki temu, ryby zostaną usunięte z eksperymentu poprzez decyzje o humanitarnym zakończeniu procedury co ograniczy ból i stres związany z agonią.

W ramach czynności doświadczalnych zaplanowana podanie adjuwantów, szczepionki i wirusa terenowego w imersji co znacznie ogranicza stres związany z tymi procedurami.

Doświadczenia zostaną przeprowadzone w warunkach i w sposób ograniczający do minimum stres oraz cierpienie zwierząt. Po zakończeniu doświadczenia zwierzęta zostaną poddane eutanazji w sposób humanitarny i całkowicie eliminujący stres, poprzez przedawkowanie środka anestetycznego.

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.