

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Biologiczne badania efektywności i bezpieczeństwa terapii fagowej na modelu zakażeń kurcząt wywołanych szczepami *Salmonella*

2. Czas trwania projektu 23.09.2019-31.12.2019

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): bakteriofagi, terapia fagowa, patogeny drobiu, *Salmonella*

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

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.

Wobec faktu nadmiernego używania antybiotyków prowadzącego do powstania bakterii lekoopornych priorytetem jest poszukiwanie innych metod ich zwalczania. Jedną z nich niewątpliwie jest fagoterapia. Celem badań jest sprawdzenie skuteczności oraz bezpieczeństwa terapii preparatem zawierającym fagi przeprowadzonej u kurcząt zakażonych *Salmonella* Typhimurium. Kurczęta w liczbie 160 sztuk podzielone zostaną na 8 grup po 20 ptaków każda. Grupa 1 będzie kontrolą negatywną (ptaki nie zakażone bakteriami patogennymi, nie otrzymujące preparatów fagowych ani antybiotyków; otrzymywać będą roztwór soli fizjologicznej przez cały okres trwania eksperymentu. Grupa 2 będzie otrzymywać preparat fagowy i nie będzie zakażana (grupa kontrolna 2). Grupa 3 będzie kontrolą pozytywną (kurczęta zostaną zakażone *Salmonella* Typhimurium i otrzymywać będą przez okres eksperymentu roztwór soli fizjologicznej). Kurczęta z grup 4-8 zostaną zakażone *Salmonella* Typhimurium, przy czym grupy 4 i 5 otrzyma dwa różne antybiotyki przez 5 dni (grupa 4 – kolistynę, a grupa 5 – enrofloksacynę). Grupa 6 otrzymywać będzie codziennie preparat fagowy. Grupa 7 otrzyma preparat fagowy 2 dni po wykryciu bakterii w odchodach, natomiast grupa 8 – po 4 dniach. Co 2 dni analizowane będą odchody kurcząt pod kątem obecności testowanych bakterii i bakteriofagów. Po

upływie 14 dni podawania fagów, połowa kurcząt będzie poddana eutanazji celem pobrania próbek do dalszych analiz. U pozostałej połowy kurcząt badana będzie obecność bakterii i fagów w odchodach przez kolejne 2 tygodnie w celu sprawdzenia czy występują zakażenia wtórne lub nosicielstwo. Przez ten okres ptakom nie będą podawane żadne preparaty. Następnie ptaki zostaną poddane eutanazji w celu pobrania narządów do dalszych analiz.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Kura domowa (*Gallus gallus domesticus*), 160 szt.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych:

PUBMED; _Google Scholar; _ AGRICOLA; Web of Science (JCR)

Wykorzystałem następujące słowa kluczowe:

bakteriofagi, terapia fagowa, patogeny drobiu, *Salmonella*

Zastąpienie:

Genomy fagów jakie będą użyte w doświadczeniach na ptakach zostały zsekwencjonowane (nie niosą genów toksyn ani genów oporności na antybiotyki oraz genów odpowiedzialnych za wbudowywanie faga do genomu gospodarza), zostały scharakteryzowane pod względem biochemicznym i molekularnym zatem są bezpieczne dla zwierząt i ludzi.

Wykonano doświadczenia laboratoryjne typu profil lizy komórek bakteryjnych oraz one step-grow w celu sprawdzenia skuteczności działania testowanych bakteriofagów na hodowlach płynnych serowaru *Salmonella* Typhimurium. Testowane fagi wykazują dużą skuteczność w lizie testowanego szczepu *Salmonella*. Sprawdzone również zdolność fagów do eliminowania biofilmów (są to struktury wyższego rzędu jakie tworzą bakterie patogenne i nie tylko, celem przetrwania niekorzystnych warunków środowiska zewnętrznego) jedno i wielogatunkowych. Biofilmy wielogatunkowe tworzą się w jelitach wszystkich zwierząt oraz człowieka. Testowane bakteriofagi wykazały wysoką skuteczność w eliminowaniu *Salmonella* Typhimurium z biofilmu jedno i wieloskładnikowego, pozostawiając nienaruszone inne składniki biofilmu.

Świadczy to o ich wysokiej swoistości oraz wskazuje, że po zastosowaniu fagów do zwalczania konkretnego serowaru *Salmonella* pozostała flora bakteryjna pozostanie nie zmieniona. Sprawdziliśmy toksyczność lizatów fagowych na komórkach ludzkich fibroblastów skóry (hdfA) w teście MTT na żywotność komórek. Testowane lizaty fagowe użyte w mianie, jak w planowanym eksperymencie na ptakach, nie wykazały cech toksyczności. W związku z powyższym w warunkach laboratoryjnych użyliśmy wszystkie możliwe modele badawcze w celu sprawdzenia bezpieczeństwa fagów w terapii. Aby potwierdzić bezpieczeństwo i skuteczność terapii fagowej w zwalczaniu infekcji bakteryjnych koniecznością staje się przetestowanie ich na zwierzętach.

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

Nie ma możliwości zastąpienia żywych zwierząt innym modelem badawczym.

Ograniczenia:

Liczba zwierząt w grupach zaplanowanych do badań została zredukowana do niezbędnego minimum umożliwiającego uzyskanie rzetelnych wyników. Podyktowane jest to dotychczasowym doświadczeniem oraz wyliczeniami statystycznymi opartymi na analizie wielkości próby z wykorzystaniem testu analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA. Dalsze ograniczenie liczby osobników w grupie i liczby grup uniemożliwiłoby otrzymanie wiarygodnych wyników, gdyż wpływ cech osobniczych może być znaczący. Dalsze ograniczenie liczby zwierząt doprowadziłoby do uzyskania wyników nieistotnych statystycznie a tym samym naraziłoby zwierzęta na niepotrzebne i bezzasadne użycie.

Wykonawca posiada duże doświadczenie w technikach i metodach doświadczalnych. Powoduje to, że każde z zaplanowanych w doświadczeniu zwierząt zostanie w pełni wykorzystane do uzyskania wiarygodnych wyników.

Usprawnienia:

W celu sprawdzenia skuteczności terapii fagowej w zwalczaniu infekcji bakteryjnych u drobiu rozważano podanie bakteriofagów, antybiotyków czy soli fizjologicznej, rozpuszczonych w wodzie, aby zminimalizować kategorię dotkliwości procedur dla ptaków. Niestety taka ewentualność nie dałaby możliwości dokładnego określenia dawki preparatu jakie ptaki spożyły i jakie miano fagów jest najbardziej skuteczne w terapii. Uzyskano by w ten sposób informację ogólną czy preparat działa czy też nie. Wobec tego faktu należałoby eksperyment powtórzyć, dlatego zdecydowano się przeprowadzić go jak opisano powyżej. Informacja o dawce preparatu jaką należy użyć jest niezwykle ważna z punktu widzenia producenta preparatu i lekarza weterynarii. Grupy doświadczalne ptaków będą od siebie oddzielone, co nie stworzy możliwości kontaktu i zafałszowania wyników, bowiem bakteriofagi łatwo przenoszą się w raz z powietrzem. Zwierzęta będą przebywały w kontrolowanych warunkach. Dzięki wieloletniej praktyce osób uczestniczących w doświadczeniach mamy pewność, że zaplanowane procedury zostaną wykonane sprawnie, szybko i przy minimalny bólu i dyskomforcie zwierząt. Doświadczenia zostaną przeprowadzone w warunkach i w sposób ograniczający do minimum stres oraz cierpienie zwierząt. Po zakończeniu doświadczeń zwierzęta zostaną poddane eutanazji w sposób humanitarny i całkowicie eliminujący stres (komora CO₂).

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.