

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1.Tytuł projektu: Opracowanie modelu infekcyjnego oraz badanie odporności i odpowiedzi immunologicznej podczas zakażenia tilapii nilowej (*Oreochromis niloticus*), pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) oraz potokowego (*Salmo trutta*) wirusem TiLV.

2.Czas trwania projektu: 12 miesięcy

3.Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): Tilapia nilowa, pstrąg tęczowy, pstrąg potokowy, TiLV, 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.

Choroby wirusowe stanowią największe zagrożenie w chowie i hodowli ryb. Często powodują one masowe śnięcia ryb hodowlanych stanowią istotny problem dla akwakultury a nawet bezpieczeństwa żywnościowego na świecie. Obecnie wśród wirusów infekujących ryby najszybciej rozprzestrzeniającym się wirusem jest Tilapia Lake Virus (TiLV). Wirus ten jest poważnym zagrożeniem dla tilapii nilowej (*Oreochromis niloticus*), ryby o dużym znaczeniu ekonomicznym. Wirus powodując duże straty hodowlane znacznie ogranicza produkcję tej ryby w szeregu krajów np. w Tajlandii. Wirus rozprzestrzenił się już na co najmniej 4 kontynentach (Azja, Afryka, Północna i Południowa Ameryka), prace nad szczepionkami są prowadzone aczkolwiek ich dostępność jest ograniczona względami finansowymi oraz prawnymi. Niewiele jest także wyników pokazujących zróżnicowanie odporności różnych linii hodowlanych tilapii oraz podatności na zakażenie ryb hodowanych w Europie.

Głównym celem projektu jest opracowanie modelu infekcyjnego oraz badanie odporności i odpowiedzi immunologicznej podczas zakażenia różnych linii hodowlanych tilapii nilowej (*Oreochromis niloticus*), wirusem TiLV, oraz zbadanie podatności pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) oraz potokowego (*Salmo trutta*) na zakażenie wirusem TiLV w różnych temperaturach.

Wyniki pozwolą wytypować najbardziej odporną linię hodowlaną tilapii, która mogłaby być użyta w programie hodowlanym, który ograniczyłby zagrożenie dla produkcji tilapii na świecie. Wyniki z badania odpowiedzi immunologicznej będą użyte do poznania w jaki sposób ryby z linii o zróżnicowanej odporności bronią się przed zakażeniem TiLV i jaka odpowiedź musi być wyzwolona żeby ryby przeżyły zakażenie. Wyniki z zakażeń pstrąga tęczowego oraz potokowego mają pokazać

czy przy zwiększających się temperaturach wód powierzchniowych w Europie istnieje zagrożenie dla tych gatunków ze strony TiLV.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Gatunek: Tilapia nilowa (*Oreochromis niloticus*); linia Dresden : 280 szt.

Gatunek: Tilapia nilowa (*Oreochromis niloticus*); linia ElMolo: 280 szt.

Gatunek: Tilapia nilowa (*Oreochromis niloticus*); linia Mansala: 280 szt.

Gatunek: pstrąg tęczy (*Oncorhynchus mykiss*); 240 szt.

Gatunek: pstrąg potokowy (*Salmo trutta*); 240 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, Web of Science, Google Scholar.

Wykorzystałem słowa kluczowe: TiLV, Nile tilapia, rainbow trout, brown trout, resistance, susceptibility, innate immune responses, adaptive immune responses

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam, że nie badano podatności wytypowanych linii tilapii nilowej na zakażenie TiLV. Istnieje jedna publikacja badająca bardzo ograniczona liczbę genów kodująca odpowiedź immunologiczną tilapii nilowej podczas zakażenia poprzez iniekcję dootrzewnową. Nie ma badań nad odpowiedzią śluzówki tilapii z różnych linii hodowlanych na zakażenie TiLV.

Ponadto, model infekcji pstrąga tęczowego i pstrąga potokowego z wykorzystaniem wirusa TiLV nie był opisany. Nie ma danych na temat podatności tych gatunków ryb na zakażenie TiLV. Nie badano ekspresji genów kodujących wybrane białka wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej ryb łososiowatych na zakażenie wirusem TiLV.

W proponowanym wniosku uwzględniono zasadę 3 R:

Replacement - zasada zastąpienia będzie spełniona poprzez następujące działania:

Część badań nad zakażeniem TiLV, została wstępnie wykonana na modelu in vitro z wykorzystaniem linii komórkowych ZF4, SJD.1 (danio pręgowanego), KFC (karpia pospolitego), E11 (węzogłów), RTG-2 i RT-Gill (pstrąga tęczowego) pochodzący we współpracy z dr Krzysztofem Rakusem (Uniwersytet Jagielloński, Kraków) z dr Mikołajem Adamkiem (Uniwersytet Medycyny Weterynaryjnej, Hanower) przeprowadzonych w różnych temperaturach (15°C, 20°C, 23°C, 25°C). Ponadto badano replikację wirusa i odpowiedź immunologiczną w eksplantach wątroby, skrzelu i mózgu w punktach czasowych 1 dni, 3 dni, 5 dni i 8 dni po zakażeniu TiLV w warunkach in vitro. Dzięki tym badaniom udało się odpowiednio dobrać punkty czasowe oraz ograniczyć ilość temperatur, w których

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

badane będzie zakażenie pstrągów. 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.

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

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. Ryby zakażone poprzez iniekcje wykorzystane zostaną do zakażenia ryb w kohabitacji.

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 anestezja jest standardową procedurą w przypadku ryb i liczne badania naukowe potwierdzają jej skuteczność oraz brak negatywnego wpływu na zwierzę.

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.