

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Optymalizacja i walidacja metody alternatywnej oznaczania mocy szczepionki Clodivac (Td) z zastosowaniem wzorca diwalentnego.**

2. Czas trwania projektu **kwiecień 2016 - grudzień 2017**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **blonica, tężec, toksoid, szczepionka, alternatywne metody oznaczania mocy**

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

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.

Clodivac jest szczepionką przeciw błonicy i tężcowi o obniżonej zawartości antygeny, przeznaczoną do czynnego uodparniania młodzieży i dorosłych. Przed dopuszczeniem do obrotu podlega ona obowiązkowej rutynowej kontroli mocy, czyli stopnia wzbudzania ochronnej odpowiedzi immunologicznej polegającej na wytwarzaniu specyficznych przeciwciał. Testy wykonywane są na zwierzętach, a moc szczepionki badanej szacuje się w odniesieniu do wystandaryzowanej szczepionki wzorcowej o mocy wyrażonej w jednostkach międzynarodowych (IU/ml).

Celem planowanego projektu jest optymalizacja i zwalidowanie metody analitycznej pozwalającej na oznaczenie mocy szczepionki Clodivac testem serologicznym wobec jednego wzorca diwalentnego (dwuskładnikowego). Wprowadzenie testu serologicznego mierzącego *in vitro* poziom specyficznych przeciwciał w surowicy immunizowanych zwierząt, jako alternatywy do podawania im toksyny, zmniejszy stopień dotkliwości procedury (zastosowanie zasady 3R w zakresie „Refinement”). Ponadto użycie wzorca diwalentnego zamiast stosowanych obecnie wzorców monowalentnych

(jednoskładnikowych) zredukuje liczbę zwierząt niezbędnych do testów (realizacja zasady 3R w zakresie „Reduction”).

Podczas badania poszczególne grupy świnek morskich będą immunizowane różnymi dawkami szczepionki Clodivac, monowalentnego wzorca błoniczego, monowalentnego wzorca tężcowego oraz wzorca diwalentnego (wzorzec błonicy w połączeniu z wzorcem tężcowym). Poziom specyficznych przeciwciał w surowicach immunizowanych zwierząt będzie oznaczany testem serologicznym ELISA. Pierwszy etap badania będzie koncentrował się na dobraniu optymalnych dawek immunizacyjnych pozwalających na uzyskiwanie równoważnych wyników oznaczania mocy komponenty błoniczej szczepionki Clodivac wobec wzorca diwalentnego oraz wzorca monowalentnego (analogiczne testy zostały już z powodzeniem przeprowadzone w naszym laboratorium dla komponenty tężcowej). W drugim etapie zoptymalizowana metoda alternatywna będzie podlegała walidacji zgodnej z wytycznymi Europejskiej Agencji Leków, co jest niezbędnym wymogiem przed wprowadzeniem jej jako standardowej procedury kontroli jakości produktu.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Kawie domowe (świnki morskie): 618 osobników

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazach danych: PUBMED, Google Scholar, Scopus.

Wykorzystałam słowa kluczowe: tetanus (diphtheria) toxoid AND elisa potency assay; combined vaccines quality control; alternative approaches for potency testing; animal refinement and reduction AND potency testing of tetanus- diphtheria vaccines.

Zapoznałam się również z wytycznymi zawartymi w Farmakopei Europejskiej, rozdziały 2.7.6 Assay of diphtheria vaccine (adsorbed) i 2.7.8 Assay of tetanus vaccine (adsorbed), a także z instrukcją WHO dotyczącą kontroli jakości szczepionek (Manual for quality control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines, World Health Organization 2013).

Na podstawie przestudiowanej literatury stwierdzam, że do rutynowej kontroli jakości poszczególnych serii szczepionek błoniczych (D, d) i tężcowych (T) można stosować metodę serologiczną polegającą na oznaczeniu miana przeciwciał w surowicach immunizowanych świnek morskich przy pomocy testu ELISA. Metody serologiczne są alternatywą do tzw. testów *challenge* dających bardzo wiarygodne wyniki, ale wiążących się z wysoką inwazyjnością i cierpieniem zwierząt (śmiertelna intoksykacja).

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

Zakrojone na szeroką skalę międzynarodowe badania standaryzacyjne wykazały równoważność wyników uzyskiwanych przy pomocy testów serologicznych oraz testów *challenge*. Na podstawie tych badań metody serologiczne mierzące poziom przeciwciał w surowicy (ELISA lub testy na komórkach VERO) zostały wprowadzone do Farmakopei Europejskiej oraz wytycznych WHO i ze względu na dobro zwierząt są obecnie rekomendowane do standardowej oceny aktywności składnika błoniczego i tężcowego szczepionek wykonywanej przed zwolnieniem produktu.

Zgodnie z ogólnym trendem, w [REDAKTOWANE], moc kolejnych partii wystandaryzowanych jednoskładnikowych szczepionek błoniczych oraz jednoskładnikowych szczepionek tężcowych oceniana jest nie testem *challenge* (4 stopień dotkliwości), ale testem serologicznym ELISA (2 stopień dotkliwości), przez co realizowana jest zasada złagodzenia (zmniejszenia dotkliwości) procedury. Celem objętego wnioskiem projektu jest posunięcie się dalej w realizacji zasady 3R i opracowanie alternatywnej metody oznaczania mocy również dla dwuskładnikowej błonico-tężcowej szczepionki Clodivac. Dane literaturowe oraz wstępne badania przeprowadzone w naszym laboratorium wskazują wyraźnie na możliwość powodzenia takiego podejścia metodologicznego.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli nam na odstępianie od oznaczania aktywności komponenty błoniczej i tężcowej szczepionki Clodivac wywołującym cierpienie testem *challenge* i zastąpienie go znacznie łagodniejszym testem serologicznym opartym na pomiarze *in vitro* miana przeciwciał w surowicy immunizowanych zwierząt. Dodatkową korzyścią planowanej metody alternatywnej będzie możliwość oznaczenia mocy obu składników szczepionki Clodivac wobec jednego wzorca diwalentnego, co zredukuje liczbę świnek morskich niezbędnych do wykonania badania. Zamiast grup immunizowanych monowalentną błoniczą szczepionką wzorcową oraz grup immunizowanych monowalentną tężcową szczepionką wzorcową będzie wprowadzać się tylko grupy immunizowane jednocześnie oboma wzorcami. Biorąc pod uwagę, że test jakości przeprowadza się rutynowo przed zwolnieniem każdej kolejnej partii szczepionki, uzyskana redukcja liczby zwierząt będzie znacząca i wzrastająca wraz z upływem czasu.

Ponadto podczas planowanych doświadczeń zasada 3R będzie realizowana poprzez właściwe, zgodne z obowiązującymi przepisami traktowanie zwierząt:

- zmniejszenie stresu poprzez stosowanie handlingu,
- zapewnienie zwierzętom dobrej kondycji psychicznej poprzez urozmaicenie warunków bytowania np. gryzaki, domki, zabawki,
- utrzymywanie zwierząt w nowoczesnej, zmodernizowanej w 2013 r. zwierzętarni spełniającej wszystkie wymagania konstrukcyjne oraz warunki środowiskowe określone w Dyrektywie 2010/63/EU,
- prowadzenie codziennego monitoringu stanu zdrowia i kondycji zwierząt,
- całodobowe monitorowanie warunków środowiskowych oraz natychmiastowe wdrożenie programu naprawczego zgodnie z instrukcją postępowania w razie awarii,
- użycie do przeprowadzenia iniekcji zwierząt materiałów wysokiej jakości, zapewniających zminimalizowanie krótkotrwałego umiarkowanego bólu np. igły iniekcyjne renomowanych firm o ostrym lancecie umożliwiającym praktycznie bezbolesne wkłucie i znikome uszkodzenie powłok skóry,
- wszystkie czynności zostaną wykonane przez przeszkolony, wykwalifikowany personel z długoletnim stażem w pracy ze zwierzętami laboratoryjnymi.