



**Corso di formazione per il personale abilitato in materia di
IMPIEGO DEGLI ANIMALI AI FINI SCIENTIFICI ED EDUCATIVI**

Bologna, 5 febbraio 2020

**CLASSIFICAZIONE PRELIMINARE DELLA GRAVITA' DELLE PROCEDURE:
SCORE ETICI, HUMANE ENDPOINT E DOLORE NEGLI ANIMALI**

Dott. Paolo Campedelli
Centro Nazionale per la Sperimentazione ed il Benessere Animale
Istituto Superiore di Sanità

All'inizio degli anni '60 si è verificato un importante cambiamento culturale che ha portato a riconoscere l'animale come essere senziente, in grado quindi di percepire dolore.

Conseguentemente, anche in ambito legislativo, è emersa la necessità di proteggere l'animale e il suo benessere.

Con il D.L.vo n. 116/92, recepimento della Direttiva 609/86/EEC, vengono introdotti il concetto di dolore, sofferenza ed angoscia riferibili agli animali in sperimentazione e quindi il riconoscimento implicito del fatto che le procedure attuate sugli animali possono avere degli effetti negativi sul loro benessere.

Per la prima volta nasce l'esigenza di tutelare il benessere degli animali e di riconoscere e quantificare il grado di dolore e sofferenza indotto nel corso delle procedure sperimentali.

Attraverso un idonea modulistica, il proponente doveva descrivere, le procedure da attuare e soprattutto doveva dichiarare il grado di sofferenza che sarebbe stato esercitato sugli animali.

In questo modo il ricercatore, autonomamente, doveva tenere in considerazione il fatto che, comunque, la ricerca avrebbe potuto determinare sull'animale dolore, sofferenza, angoscia o danni durevoli e quindi conseguentemente la necessità di operare scelte nelle procedure e nelle metodiche finalizzate a ridurre tali condizioni.

Tra l'altro, nel D.L.vo n.116/92, il grado di dolore e di sofferenza che veniva provocato sull'animale permetteva di stabilire il tipo di regime a cui il protocollo sperimentale andava soggetto



Comunicazione

Autorizzazione

Negli anni successivi l'aumentata sensibilità sulla tutela degli animali, la credibilità della scienza, l'ampliamento dell'UE a 28 paesi, la necessità di armonizzare il mercato della ricerca, supportati da varie petizioni e sondaggi effettuati tramite l'EUROBAROMETRO, hanno fatto emergere la necessità di modificare la normativa, anche in considerazione del fatto che la Direttiva 609/86 non faceva alcun esplicito riferimento alla piena applicazione del principio delle 3R, considerato ormai da tempo come principio cardine nell'ambito della sperimentazione animale.

Articolo 4

Principio della sostituzione, della riduzione e del perfezionamento

1. Gli Stati membri assicurano che, ove possibile, un metodo o una strategia di sperimentazione scientificamente soddisfacente che non comporti l'uso di animali vivi possa essere utilizzato in sostituzione di una procedura.

DECRETO LEGISLATIVO 4 marzo 2014, n. 26.

Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. (14G00036) Pag. 2

Art. 1.

Oggetto e ambito di applicazione

1. Il presente decreto stabilisce misure relative alla protezione degli animali utilizzati ai fini scientifici o educativi, a tal fine, sono disciplinati i seguenti aspetti:

Art. 13.

Scelta dei metodi

1. Non sono autorizzabili le procedure che prevedono l'impiego di animali vivi per le quali esistono altri metodi o strategie di sperimentazione, riconosciute dalla legislazione dell'Unione europea, ovvero prevedono metodi vietati dalla normativa vigente nazionale.

2. Qualora il ricorso all'impiego di animali è inevitabile sono seguite, a parità di risultati, le procedure che:

- a) richiedono il minor numero di animali;
- b) utilizzano animali con la minore capacità di provare dolore, sofferenza, distress o danno prolungato;
- c) sono in grado di minimizzare dolore, sofferenza, distress o danno prolungato;
- d) offrono le maggiori probabilità di risultati soddisfacenti;
- e) hanno il più favorevole rapporto tra danno e beneficio.

3. Nelle procedure di cui al comma 2, va evitata la morte come punto finale, preferendo punti finali più precoci e umanitari. Qualora la morte come punto finale è inevitabile, la procedura soddisfa le seguenti condizioni:

- a) comportare la morte del minor numero possibile di animali;
- b) ridurre al minimo la durata e l'intensità della sofferenza dell'animale, garantendo per quanto possibile una morte senza dolore.

Art. 22.

Requisiti per impianti, attrezzature, sistemazione e cura degli animali

1. L'autorità competente di cui all'articolo 4 verifica, nel corso delle ispezioni di cui all'articolo 30, che ogni stabilimento di allevamento, di fornitura e di utilizzazione dispone dei requisiti di cui all'allegato III del presente decreto, sezione I e sezione II a partire dalle date ivi stabilite, nonché di:

a) impianti e attrezzature adeguati alle specie animali ospitate e allo svolgimento delle attività e delle procedure laddove condotte;

b) un numero adeguato di persone qualificate per garantire la cura e il controllo giornaliero degli animali nonché il corretto funzionamento della struttura, degli impianti e delle attrezzature.

2. La progettazione, la costruzione e le modalità di funzionamento degli impianti e delle attrezzature di cui al comma 1 sono realizzate a garanzia di uno svolgimento il più efficace possibile delle attività e delle procedure, nonché al fine di ottenere risultati affidabili usando il minor numero possibile di animali e con il minor grado di dolore, sofferenza, distress o danno prolungato.

3. La persona di cui all'articolo 3, comma 1, lettera h), è responsabile della sistemazione e della cura degli animali e assicura, in particolare, che:

a) gli animali dispongono, in conformità ai requisiti di cui all'allegato III del presente decreto, di alloggio e godono di un ambiente, di un'alimentazione, di acqua e di cure adeguate alla loro salute e al loro benessere;

b) qualsiasi limitazione alla possibilità dell'animale di soddisfare i bisogni fisiologici e comportamentali è mantenuta al minimo;

c) le condizioni fisiche in cui gli animali allevati, tenuti o utilizzati sono soggette a controlli giornalieri;

d) sono adottate misure intese a eliminare tempestivamente qualsiasi difetto o dolore, sofferenza, distress o danno prolungato evitabili eventualmente rilevati;

e) gli animali sono trasportati in condizioni appropriate tali da ridurre al minimo sofferenza e stress in relazione alla specie, alla durata dello spostamento e al tipo di mezzo impiegato.

4. Per motivi scientifici legati al benessere o alla salute degli animali, l'autorità competente secondo gli ambiti di cui all'articolo 4 può rilasciare specifici provvedimenti di autorizzazione adottati ai sensi dell'articolo 20, commi 1 e 2, mediante disposizioni di deroga rispetto a quanto previsto dal comma 3, lettera a).

Art. 16.

Riutilizzo degli animali impiegati nelle procedure

1. Un animale già usato in una o più procedure può essere riutilizzato in altre procedure solo se sono soddisfatte le seguenti condizioni:

- a) l'effettiva gravità delle procedure precedenti era «lieve» o «moderata»;
- b) è dimostrato che è stato pienamente ripristinato il benessere e lo stato di salute generale dell'animale;
- c) la procedura successiva è classificata come «lieve» o «moderata» o «non risveglio»;
- d) la procedura successiva è classificata come «lieve» o «non risveglio»;
- e) il veterinario designato di cui all'articolo 24, ha espresso parere positivo tenuto conto delle esperienze dell'animale nel corso di tutta la sua vita.

2. In deroga a quanto previsto dal comma 1, lettera a), il Ministero, previo parere favorevole del veterinario designato di cui al comma 1, lettera e), può eccezionalmente autorizzare il riutilizzo di un animale già impiegato in procedure classificate come gravi nelle procedure di cui al comma 1, lettera c), fino al 31 dicembre 2016 e, a decorrere dal 1° gennaio 2017, nelle procedure di cui al comma 1, lettera d).

Art. 32.

Valutazione retrospettiva

1. Il Ministero effettua la valutazione retrospettiva del progetto, se prevista dall'autorizzazione di cui all'articolo 31, richiedendo, ove ritenuto necessario, una valutazione tecnico-scientifica agli enti di cui all'articolo 31, comma 3.

2. La valutazione retrospettiva viene effettuata sulla base della documentazione presentata dal responsabile di cui all'articolo 3, comma 1, lettera g), e verte sui seguenti aspetti:

- a) il raggiungimento degli obiettivi del progetto;
- b) le specie e il numero di animali utilizzati, il danno inflitto e la gravità delle procedure impiegate;
- c) gli elementi che possono contribuire a potenziare l'applicazione dei requisiti di sostituzione, riduzione e perfezionamento.

3. Per i progetti che fanno uso di primati non umani ed i progetti che comportano procedure classificate come «gravi» il Ministero effettua sempre la valutazione retrospettiva.

4. Al di fuori dei casi di cui al comma 3, il Ministero può esentare dalla valutazione retrospettiva i progetti che prevedono procedure classificate come «lievi» o «non risveglio».

Disciplina del personale abilitato

1. L'autorità competente, secondo gli ambiti di cui all'articolo 4 verifica che l'allevatore, il fornitore, l'utilizzatore ed il responsabile di cui all'articolo 3, comma 1, lettera g), dispongono di personale sufficiente, in relazione al tipo di attività, al numero, alle specie di animali mantenute, alla natura delle procedure.

2. Il personale dispone di un livello di istruzione e di formazione adeguato, acquisito, mantenuto e dimostrato secondo le modalità definite con decreto del Ministro sulla base degli elementi di cui all'allegato V del presente decreto, per svolgere una delle seguenti funzioni:

- a) la realizzazione di procedure su animali;
- b) la concezione delle procedure e di progetti;
- c) la cura degli animali;
- d) la soppressione degli animali.

3. Le funzioni di cui alla lettera b) del comma 2, sono svolte da personale che ha ricevuto la pertinente formazione scientifica, dispone di conoscenze specifiche sulla specie interessata e garantisce:

a) l'interruzione di qualunque procedura nel corso della quale all'animale vengono inflitti evitabili dolore, sofferenza, distress o danno prolungato;

b) la realizzazione dei progetti in conformità all'autorizzazione concessa o, nei casi di cui all'articolo 33 in conformità con la domanda inviata all'autorità competente, ovvero in conformità a qualsiasi decisione successiva adottata dall'autorità competente, ed assicura che, in caso di inosservanza, le misure adeguate per porvi rimedio siano adottate e registrate.

4. Il personale nell'espletamento delle funzioni di cui alle lettere a), c) o d) del comma 2, opera sotto la supervisione della persona responsabile del benessere, dell'assistenza degli animali e del funzionamento delle attrezzature di cui all'articolo 20, comma 4, lettera c), finché non abbia dato prova del possesso delle competenze richieste.

h) responsabile del benessere animale, la persona responsabile del benessere e dell'assistenza degli animali e del funzionamento delle attrezzature di uno o più stabilimenti;

Veterinario designato

1. Ciascun allevatore, fornitore o utilizzatore deve disporre di un medico veterinario designato, esperto in medicina degli animali da laboratorio, in possesso di requisiti di esperienza e di formazione specifica, che prescrive le modalità per il benessere e il trattamento terapeutico degli animali.

Art. 26.

Compiti dell'organismo preposto al benessere degli animali

1. L'organismo preposto al benessere degli animali di cui all'articolo 25 svolge almeno i seguenti compiti:

a) consiglia il personale che si occupa degli animali su questioni relative al benessere degli animali in relazione alla loro acquisizione, sistemazione, cura e impiego;

b) consiglia il personale nell'applicazione del principio della sostituzione, della riduzione e del perfezionamento, lo tiene informato sugli sviluppi tecnici e scientifici e promuove l'aggiornamento professionale del personale addetto all'utilizzo degli animali;

c) definisce e rivede i processi operativi interni di monitoraggio, di comunicazione e di verifica legati al benessere degli animali alloggiati o utilizzati nello stabilimento;

d) esprime un parere motivato sui progetti di ricerca e sulle eventuali successive modifiche, dandone comunicazione al responsabile del progetto;

e) inoltra le domande di autorizzazione dei progetti di ricerca di cui agli articoli 31 e 33, dandone comunicazione al responsabile del progetto;

f) segue lo sviluppo e l'esito dei progetti di ricerca tenendo conto degli effetti sugli animali utilizzati nonché individuando e fornendo consulenza su elementi che contribuiscono ulteriormente ai principi della sostituzione, della riduzione e del perfezionamento;

g) fornisce consulenza in merito ai programmi di reinserimento, compresa l'adeguata socializzazione degli animali che devono essere reinseriti.

2. Ai fini del rilascio del parere di cui al comma 1, lettera d), l'organismo preposto al benessere degli animali valuta:

a) la corretta applicazione del presente decreto;

b) la rilevanza tecnico-scientifica del progetto;

c) gli obblighi derivanti dalle normative europee e internazionali o farmacopec per lo sviluppo e la sicurezza dei farmaci e i saggi tossicologici relativi a sostanze chimiche e naturali;

d) la possibilità di sostituire una o più procedure con metodi alternativi di cui all'articolo 1, comma 2;

e) l'adeguata formazione e la congruità dei ruoli professionali del personale utilizzatore indicato nel progetto;

f) la valutazione del danno/beneficio.

3. I componenti dell'organismo assolvono il loro mandato in regime di riservatezza.

4. L'organismo riporta in appositi registri, messi a disposizione dell'autorità competente, le consulenze fornite e le relative decisioni e provvede alla loro conservazione per un periodo di almeno sei anni.

DEFINIZIONI

DOLORE: esperienza sensoriale ed emozionale spiacevole, associata ad un potenziale od effettivo danno tissutale.

STRESS: risposta adattativa dell'organismo a seguito di fattori fisici, fisiologici, emozionali (fattori stressanti).

DISTRESS: stato di mancato adattamento ad alterazioni ambientali od a stimoli interni.

Uno stato di distress prolungato o di notevole intensità può portare a problemi comportamentali (interazioni sociali, riproduzione, ...) od a situazioni patologiche (lesioni gastriche ed intestinali, immunosoppressione,...).

SOFFERENZA: conseguenza finale, non facilmente alleviabile, di un'esposizione prolungata a diverse condizioni (dolore, distress, ...)

ANGOSCIA: *“Tormentosa oppressione dell'animo che può nascere da uno stato di dubbio o di inquietudine, oppure da paura, dolore, pena”* (Devoto Oli)

Il dolore, lo stress, la sofferenza e l'angoscia sono concetti che descrivono condizioni riferite direttamente all'uomo e presentano notevoli difficoltà interpretative se applicati agli animali utilizzati per fini sperimentali, ma mentre il dolore, lo stress ed il distress rappresentano concetti ipoteticamente «misurabili» (vedi indicatori clinici, biochimici e comportamentali), i termini di sofferenza e angoscia rientrano in un ambito più strettamente antropologico, maggiormente legati alla sfera psicologica.

| Behavioral | Physiological | Biochemical |
|----------------------|----------------------|-----------------|
| Grooming | Temperature | Corticosteroids |
| Appetite | Pulse | Catecholamines |
| Activity | Respiration | Thyroxin |
| Aggression | Weight loss | Prolactin |
| Facial expression | Blood-cell count | β-Endorphin |
| Vocalization | Blood-cell structure | ACTH |
| Appearance | Cardiac output | Glucagon |
| Posture | Blood flow | Insulin |
| Response to handling | | Vasopressin |
| | | Substance P |

Valutazione oggettiva (dolore, stress, distress)



IPOPALAMO - IPOFISI - SURRENE/SISTEMA NERVOSO AUTONOMO

Catecolamine: tachicardia/tachipnea
ipertensione
aumento gittata cardiaca
vasocostrizione
↑ glucagone
↓ insulina

Corticosteroidi: potenziano effetti catecolamine
linfopenia
↓ tasso anticorpale

Valutazione soggettiva (sofferenza, angoscia): condizioni più difficilmente quantificabili

| ARTICOLO 31 | ALLEGATO VI |
|--|---|
| p) preventiva valutazione sulla gravità delle procedure, nonché di una classificazione delle stesse secondo i criteri di cui all'articolo 15 e all'Allegato VII del presente decreto | <u>Allegato VI: punto 26 - punto 21</u> |
| q) necessità di eseguire o meno una valutazione retrospettiva del progetto di cui all'articolo 32 | <u>Allegato VI: punto 26</u> |

26. Classificazione della gravità delle procedure ai sensi dell'art.15 e dell'Allegato VII

- non risveglio
- lievi
- moderate
- gravi

DEFINIZIONE DI PROCEDURA

Art. 3.

Definizioni

1. Ai fini del presente decreto si intende per:

a) procedura, qualsiasi uso, invasivo o non invasivo, di un animale ai fini sperimentali o ad altri fini scientifici dal risultato noto o ignoto, o ai fini educativi, che possa causare all'animale un livello di dolore, sofferenza, distress danno prolungato equivalente o superiore a quello provocato dall'inserimento di un ago secondo le buone prassi veterinarie. Ciò include qualsiasi azione che intende o può determinare la nascita o la schiusa di un animale o la creazione e il mantenimento di una linea di animali geneticamente modificata con fenotipo sofferente in queste condizioni. È esclusa dalla definizione la soppressione di animali con il solo fine di impiegarne gli organi o i tessuti;

Procedura: induzione di patologie, di uno stato infiammatorio, impiego di modelli di patologia o di animali GM con fenotipo sofferente, ...

DECRETO LEGISLATIVO 26/14: GRAVITA' DELLE PROCEDURE

Art. 15.

Classificazione della gravità delle procedure

1. Le procedure sono classificate, caso per caso, secondo i criteri di assegnazione di cui all'allegato VII del presente decreto, come:

- a)* non risveglio;
- b)* lievi;
- c)* moderate;
- d)* gravi.

CLASSIFICAZIONE DELLA GRAVITÀ DELLE PROCEDURE

La gravità della procedura è determinata in base al livello di dolore, sofferenza, angoscia o danno prolungato cui sarà presumibilmente sottoposto il singolo animale nel corso della procedura stessa.

Sezione I: Categorie di gravità

Non risveglio:

Le procedure condotte interamente in anestesia generale da cui l'animale non può riprendere coscienza sono classificate come "non risveglio".

Lieve:

Le procedure sugli animali che causano probabilmente dolore, sofferenza o angoscia lievi e di breve durata, nonché le procedure che non provocano un significativo deterioramento del benessere o delle condizioni generali degli animali sono classificate come "lievi".

Moderata:

Le procedure sugli animali che causano probabilmente dolore, sofferenza o angoscia moderati e di breve durata, ovvero dolore, sofferenza o angoscia lievi e di lunga durata, nonché le procedure che provocano probabilmente un deterioramento moderato del benessere o delle condizioni generali degli animali sono classificate come "moderate".

Grave:

Le procedure sugli animali che causano probabilmente dolore, sofferenza o angoscia intensi, ovvero dolore, sofferenza o angoscia moderati e di lunga durata, nonché le procedure che provocano probabilmente un deterioramento grave del benessere o delle condizioni generali degli animali sono classificate come "gravi".

ESEMPI DI GRAVITA' DELLE PROCEDURE

1. Lieve:

- a) somministrazione di anestesia, ad esclusione della somministrazione ai soli fini della soppressione;
- b) studio farmacocinetico, con somministrazione di dose unica, numero limitato di prelievi ematici (in totale <10% del volume circolante) e sostanza che non dovrebbe causare effetti avversi riscontrabili;
- c) tecnica non invasiva per immagini (ad esempio MRI) con opportuna sedazione o anestesia;
- d) procedure superficiali, ad esempio biopsie di orecchio e coda, impianto sottocutaneo non chirurgico di mini-pompe o transponder;
- e) applicazione di dispositivi telemetrici esterni che causano solo lievi menomazioni o interferenze con l'attività e il comportamento normali;
- f) somministrazione, per via sottocutanea, intramuscolare, intraperitoneale, mediante sonda ed endovenosa attraverso i vasi sanguigni superficiali, di sostanze con effetto lieve o nullo e in volumi nei limiti appropriati alla taglia e alla specie dell'animale;

- g) induzione di tumori o tumori spontanei che non causano effetti clinici avversi riscontrabili (ad esempio piccoli noduli sottocutanei non invasivi);
- h) riproduzione di animali geneticamente modificati da cui dovrebbe risultare un fenotipo con effetti lievi;
- i) alimentazione con diete modificate che non soddisfano tutte le esigenze nutrizionali degli animali e si prevede causino anomalie cliniche lievi nell'arco di tempo dello studio;
- j) confinamento di breve durata (<24h) in gabbie metaboliche;
- k) studi che comportano la privazione di breve durata del partner sociale, la messa in gabbia di breve durata di ratti o topi adulti socievoli;
- l) modelli in cui gli animali sono sottoposti a stimoli nocivi, brevemente associati a dolore, sofferenza o angoscia lievi a cui gli animali possono sottrarsi;
- m) la combinazione o l'accumulo degli esempi seguenti può condurre ad una classificazione "lieve";
 - i) valutazione della composizione corporea con tecniche non invasive e contenimento fisico minimo;
 - ii) controllo elettrocardiografico con tecniche non invasive e contenimento fisico minimo o nullo di animali abituati;
 - iii) applicazione di dispositivi telemetrici esterni che non causano probabilmente alcuna menomazione ad animali socialmente abituati e non interferiscono con l'attività e il comportamento normali;
 - iv) riproduzione di animali geneticamente modificati da cui non dovrebbe risultare un fenotipo avverso clinicamente riscontrabile;
 - v) aggiunta di marker inerti alla dieta per seguire il passaggio del contenuto gastrointestinale;
 - vi) sospensione dell'alimentazione per < 24 ore nei ratti adulti;
 - vii) sperimentazioni in ambiente naturale.

2.

Moderata:

- a) Applicazione frequente di sostanze di prova che producono effetti clinici moderati e prelievo di campioni ematici (>10% del volume circolante) in animali coscienti, nell'arco di alcuni giorni senza sostituzione del volume;
- b) studi per determinare i dosaggi che producono effetti acuti, test di tossicità cronica/cancerogenicità con punti finali non letali;
- c) chirurgia in anestesia generale e somministrazione di idonei analgesici, associata a dolore, sofferenza o deterioramento delle condizioni generali post-chirurgici. Esempi: toracotomia, craniotomia, laparotomia, orchietomia, linfadenectomia, tiroidectomia, chirurgia ortopedica con stabilizzazione efficace e trattamento delle lesioni, trapianto di organi con trattamento efficace dei rigetti, impianto chirurgico di cateteri o dispositivi biomedici (ad esempio trasmettitori telemetrici, mini-pompe, ecc.);
- d) modelli di induzione di tumori o tumori spontanei che si prevede causino dolore o angoscia moderati o interferenza moderata con il comportamento normale;
- e) irradiazione o chemioterapia in dose subletale o dose altrimenti letale ma con ricostituzione del sistema immunitario. Gli effetti avversi previsti dovrebbero essere lievi o moderati e di breve durata (<5 giorni);
- f) riproduzione di animali geneticamente modificati da cui dovrebbe risultare un fenotipo con effetti moderati;
- g) creazione di animali geneticamente modificati mediante procedure chirurgiche;
- h) uso di gabbie metaboliche con restrizione moderata del movimento per un lungo periodo (fino a 5 giorni);
- i) studi con uso di diete modificate che non soddisfano tutte le esigenze nutrizionali degli animali e che si prevede causino anomalie cliniche moderate nell'arco di tempo dello studio;
- j) sospensione dell'alimentazione per <48 ore nei ratti adulti;
- k) induzione della fuga e di reazioni di evitamento nei casi in cui l'animale è incapace di rispondere con la fuga o di sottrarsi agli stimoli, che si prevede causi angoscia moderata.

3.

Grave:

- a) Prove di tossicità in cui la morte è il punto finale, o si prevedono decessi accidentali e sono indotti stati patofisiologici gravi. Ad esempio, prova di tossicità acuta con dose unica (v. orientamenti OCSE in materia di prove);
- b) prova di dispositivi che, in caso di guasti, possono causare dolore o angoscia intensi o la morte dell'animale (ad esempio dispositivi cardiaci);
- c) prova di potenza dei vaccini caratterizzata da deterioramento persistente delle condizioni dell'animale, graduale malattia che porta alla morte, associate a dolore, angoscia o sofferenza moderati e di lunga durata;
- d) irradiazione o chemioterapia in dose letale senza ricostituzione del sistema immunitario, ovvero con ricostituzione e reazione immunologica contro l'ospite nel trapianto;
- e) modelli di induzione di tumori o tumori spontanei che si prevede causino malattia progressiva letale associata a dolore, angoscia o sofferenza moderati di lunga durata. Ad esempio, tumori che causano cachessia, tumori ossei invasivi, tumori metastatizzati e tumori che causano ulcerazioni;
- f) interventi chirurgici e di altro tipo in anestesia generale che si prevede causino dolore, sofferenza o angoscia postoperatori intensi, oppure moderati e persistenti, ovvero deterioramento grave e persistente delle condizioni generali dell'animale. Produzione di fratture instabili, toracotomia senza somministrazione di idonei analgesici, ovvero traumi intesi a produrre insufficienze organiche multiple;
- g) trapianto di organi in cui il rigetto può causare angoscia intensa o deterioramento grave delle condizioni generali dell'animale (ad esempio xenotrapianto);
- h) riproduzione di animali con alterazioni genetiche che si prevede causino deterioramento grave e persistente delle condizioni generali, ad esempio morbo di Huntington, distrofia muscolare, nevriti croniche recidivanti;
- i) uso di gabbie metaboliche con limitazione grave del movimento per un lungo periodo;
- j) scosse elettriche inevitabili (ad esempio per indurre impotenza acquisita);
- k) isolamento completo di specie socievoli per lunghi periodi, ad esempio cani e primati non umani;
- l) stress da immobilizzazione per indurre ulcere gastriche o insufficienze cardiache nei ratti;
- m) nuoto forzato o altri esercizi in cui il punto finale è l'esaurimento.

CRITERI DI ASSEGNAZIONE

ALLEGATO VII

CLASSIFICAZIONE DELLA GRAVITÀ DELLE PROCEDURE

La gravità della procedura è determinata in base al livello di dolore, sofferenza, angoscia o danno prolungato cui sarà presumibilmente sottoposto il singolo animale nel corso della procedura stessa.

Sezione II: Criteri di assegnazione

L'assegnazione della categoria di gravità tiene conto di ogni intervento o manipolazione cui è sottoposto un animale nell'ambito di una determinata procedura. Essa è basata sugli effetti più gravi che rischia di subire il singolo animale dopo che sono state applicate tutte le opportune tecniche di affinamento.

CRITERI DI ASSEGNAZIONE

Fattori legati all'animale: fenotipo, età, stato immunitario, specie, ceppo (animali GM, soggetti anziani sottoposti ad esercizio fisico, differente *acquaticità* tra ratto e topo, ...)

Livello e durata del contenimento

Manipolazioni chirurgiche (soprattutto il rischio postoperatorio)

Mancato ricorso all'anestesia/analgesia

Sensibilità tissutale (alta concentrazione di nocicettori)

Ritmi diurni

Elementi ambientali (isolamento sociale, restrizione alimentare, separazione materna, ...)

Procedure ripetute ed intervalli che intercorrono tra di loro (non sempre indice di gravità)

Sofferenza cumulativa

Persistenza di dolore dopo la procedura

Uso continuato dell'animale (riutilizzo)

Gestione del dolore e della sofferenza

- Responsabile del progetto
- OPBA
- Veterinario Designato
- Responsabile del Benessere
- Tutto lo staff sperimentale

VALUTAZIONE DELLA GRAVITÀ – UN PROCESSO CONTINUO



Procedura (induzione di patologie, di uno stato infiammatorio, impiego di modelli di patologia, ...)



Effetti avversi → **Strategie per limitarli**



Strategie per monitorare le condizioni degli animali
(frequenza dei controlli, valutazione di parametri clinici/comportamentali,...)

Endpoint umanitari

WORKING DOCUMENT ON A SEVERITY ASSESSMENT FRAMEWORK

| Macro-categorie | Aspetti sui quali concentrare l'attenzione nell'osservazione degli animali | Indicatori specifici da monitorare |
|-------------------|---|--|
| Aspetto | Condizione fisica | Aumento/ calo ponderale |
| | | Obesità |
| | | Magrezza |
| | | Punteggio di valutazione della condizione fisica, se disponibile |
| | Stato del mantello e della cute | Piloerezione |
| | | Mantello arruffato/ assenza di <i>grooming</i> (cura di sé) |
| | | Mantello untuoso |
| | | Alopecia/perdita di pelo |
| | | Disidratazione: perdita di elasticità e turgore della cute (<i>skin tenting</i>) |
| | | Lesioni della cute: tumefazione; crosta; ulcerazione; lesione/ferita |
| | | Tracce di feci o di urina |
| | Scarico | Oculare; nasale; uro-genitale; secrezioni di porfirina in alcune specie, ad esempio il ratto |
| | Occhi | Infossati o "spenti" |
| | | Chiusi/socchiusi |
| | | Danno/lesione oculare (ad esempio ulcera corneale) |
| | Bocca | Salivazione |
| | | Malocclusione/denti sporgenti |
| Altro | Espressione facciale di dolore: ad es. occhi socchiusi e naso protuberante (<i>nose bulge</i>) nei topi | |
| | Costrizione addominale | |
| | Gonfiore di una parte del corpo, ad esempio addome gonfio | |
| Funzioni corporee | Respirazione | Respirazione accelerata (tachipnea) |
| | | Respirazione difficoltosa (iperpnea) |
| | | Respirazione molto difficoltosa (dispnea) |
| | | Respirazione con ansimazione o emissione di altri suoni |
| | Assunzione di cibo/acqua | Aumentata/ridotta |
| | Temperatura corporea | Ipertermia/ipotermia; misurazioni della temperatura corporea, se disponibili (effettuate ad es. per mezzo di microchip o dispositivi telemetrici, termometri a contatto o senza contatto); colore delle estremità nei roditori |
| | Sensi | Indebolimento della vista, dell'udito e dell'equilibrio |

WORKING DOCUMENT ON A SEVERITY ASSESSMENT FRAMEWORK

| Macro-categorie | Aspetti sui quali concentrare l'attenzione nell'osservazione degli animali | Indicatori specifici da monitorare |
|---------------------------------------|--|---|
| Ambiente | Ambiente di stabulazione, ivi compresi lettieri, materiale per i nidi, elementi utilizzati per l'arricchimento ambientale | Presenza e consistenza delle feci |
| | | Giaciglio bagnato, ad esempio a causa di poliuria |
| | | Presenza di vomito o sangue |
| | | Utilizzo o meno da parte dell'animale degli elementi forniti per l'arricchimento ambientale, ad es. materiale per i nidi, blocchi da rosicchiare |
| Comportamenti | Interazione sociale | Alterazioni del temperamento normale: interazioni apprensive/aggressive con altri animali; ansietà (ad esempio marcate reazioni di fuga, tendenza a nascondersi) |
| | | Isolamento o ritiro dagli altri animali nel gruppo sociale |
| | Comportamenti indesiderabili | Comportamento ripetitivo/ stereotipie |
| | | Taglio di pelo e vibrisse (<i>barbering</i>) nei roditori, tricotillomania |
| | | Aumento dell'aggressività verso gli esseri umani o altri animali |
| | Postura e mobilità | Postura anormale |
| | | Andatura anormale; claudicazione; mancanza di movimento/letargia/riluttanza a muoversi se stimolato |
| | | Movimenti non coordinati |
| | | Addome retratto; testa reclinata |
| | Altro | Tremori |
| | | Crisi/convulsioni/spasmi |
| | | Vocalizzazioni; spontanee o evocate (<i>Nota: alcune specie, ad esempio i roditori, vocalizzano di solito nella gamma ultrasonica e pertanto le vocalizzazioni udibili sono particolarmente preoccupanti. Anche le</i> |
| | | |
| Indicatori procedura-specifici | Vengono definiti in base al singolo progetto, ai suoi potenziali effetti avversi e ai relativi indicatori previsti. | In un modello EAE gli indicatori potrebbero essere, ad esempio: coda atonica, debolezza degli arti posteriori, debolezza degli arti anteriori, paralisi, incontinenza urinaria. |
| Osservazioni libere | Ogni piano di valutazione della gravità dovrebbe comprendere una sezione per registrare qualsiasi osservazione relativa a impatti negativi imprevisti sul benessere degli animali. | |

ENDPOINT UMANITARIO

Legata direttamente al livello di gravità è la determinazione dell'**endpoint umanitario della procedura** cioè di quel punto oltre il quale il dolore e la sofferenza dell'animale non sono più accettabili.

Gli endpoint umanitari devono essere chiaramente definiti e basati su criteri oggettivi.

Non devono oltrepassare quelli scientifici (non è accettabile mantenere un animale in uno stato di dolore e/o sofferenza per un periodo più lungo di quello giustificato scientificamente; quando l'obiettivo è perseguito mantenere in vita l'animale non da alcun valore aggiunto ai risultati)

Tale scelta sarà compito *in primis* del proponente che dovrà definire gli endpoint, valutando degli obiettivi scientifici che si vogliono raggiungere, i possibili effetti avversi e la progressione temporale più probabile di questi effetti.

Successivamente, sarà compito dell'Organismo per il Benessere degli Animali controllare ed eventualmente modificare tali endpoint.

La determinazione degli endpoint umanitari può includere:

- Modifiche del peso corporeo
- Modifiche delle condizioni fisiche generali
- Modifiche dei parametri fisiologici (temperatura, frequenza cardiaca e respiratoria).
- Modifiche comportamentali
- Segni clinici

Tumori solidi:

- La massa tumorale non deve incidere sulle normali funzioni fisiologiche dell'animale.
- Diametro della massa tumorale (nel topo cm 1,2)
- Perdita di peso progressiva (non deve superare il 20% del peso normale di un'animale dello stesso ceppo alla stessa età).
- Non devono essere presenti ulcere/infezioni sul sito

Encefalite autoimmune sperimentale:

0: nessun sintomo

1: perdita di tono della coda

2: paresi zampe posteriori

3: paralisi zampe posteriori

4: tetraplegia

5: moribondo

Studi sul dolore:

- minimo numero di animali
- esposizione di intensità e durata minima sufficiente a raggiungere lo scopo dell'esperimento (non è accettabile impiegare livelli sovrasoglia)
- preferenza (quando possibile) per i test di evitamento
- prevedere misure adeguate per quei test in cui il dolore si protrae oltre il tempo necessario all'esperimento
- somministrazione di analgesici nei modelli di dolore cronico o giustificazione del mancato ricorso.

ISCHEMIA

2007).

Deficit neurologici generali

| Deficit neurologici generali | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 9 | 12 |
|------------------------------|--------------|--|---|--|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------|
| Pelo | Normale | Sporcizia localizzata, vicino al muso e agli occhi | Sporcizia generalizzata | - | - | - | - | - |
| Orecchie | Normali | Rilassate, ma responsive | Rilassate e non responsive | - | - | - | - | - |
| Occhi | Normali | Con secrezioni acquose | Con secrezioni scure | Semichiusi | Chiusi | - | - | - |
| Postura | Normale | Curva, instabile | Testa o parte del corpo restano sul pavimento | Reclinato da un capo, ma può alzarsi diritto con un pò di sforzo | Passivo, resta come è stato messo | - | - | - |
| Attività spontanea | Normale | Calmo, quieto, esplora lentamente | Inerte, sonnolente, non esplora | Letargico, appena si muove | Nessun movimento spontaneo | - | - | - |
| Caratteristiche epilettiche | Non presenti | - | - | Iperattivo | - | Aggressivo, ipereccitato | Estremamente ipereccitato | Accenni di grande male |

ISCHEMIA

Deficit neurologici focali

| Deficit neurologici focali | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---|--|
| Simmetria del corpo (in movimento sul banco) | Normale | Leggera asimmetria | Moderata asimmetria | Prominente asimmetria | Estrema asimmetria |
| Andatura (in movimento sul banco) | Normale | Rigida, non flessibile | zoppicante | Pesante, con cadute e deficits vistosi | Non cammina |
| Arrampicata (aggrappato ad una superficie inclinata di 45°) | Normale | Lenta e faticosa | Si tiene fermo, ma non sale | Scivola verso il basso | Cade senza cercare di mantenersi |
| Traiettoria (in movimento sul banco) | Gira ugualmente a destra e a sinistra | Preferenzialmente da un lato | Gira da un lato (non costantemente) | Gira costantemente da un lato | Gira come su un perno, lentamente o non si muove |
| Simmetria zampe anteriori (sospeso) | Normale | Leggera asimmetria | Moderata asimmetria | Prominente | Leggera asimmetria, si muove poco o non |
| sul tavolo per la coda) | | | | asimmetria | si muove |
| Cerchi compulsivi (tenuto per la coda su di un piano a superficie liscia) | Non presenti | Tendenza ad avanzare da un lato | Gira solo da un lato | Gira fiaccamente da 1 lato, non in un cerchio completo | Non avanza |
| Risposta sensoriale (toccare leggermente dal retro) | Risposta simmetrica | Leggera asimmetria | Prominente asimmetria | Risposta ipsilaterale diminuita, controlaterale assente | Risposta assente in entrambi i lati |

STUDIO PILOTA:

Quando gli effetti di una sostanza o di una nuova procedura sono sconosciuti, può essere necessario ricorrere ad uno **studio pilota**.

Uno studio pilota, che dovrà essere presentato dal proponente per la specifica autorizzazione, dovrà essere elaborato usando un piccolo numero di animali e può aiutare a determinare la morbilità, il tempo che intercorre dalla comparsa dei primi sintomi e soprattutto la frequenza delle osservazioni necessarie per stabilire gli *endpoint*.

Uno studio pilota può anche fornire indicazioni sulla variabilità delle risposte tra i diversi gruppi sperimentali e può fornire l'opportunità a tutto il personale coinvolto di acquisire esperienza con i sintomi previsti.

SCORE CLINICI

Tabella 1 - Variabili cliniche per la valutazione del dolore negli animali da laboratorio.
(modificata da Morton e Griffiths, 1985)

PESO CORPOREO

- 0 - Mantenuto o aumentato; alimentazione e defecazione normale.
- 1 - Incerto o diminuito di meno del 5%.
- 2 - Diminuito del 10-15%; alimentazione ridotta, feci alterate o ridotte; assunzione di acqua e cibo aumentata o diminuita.
- 3 - Diminuito di più del 20%; condizioni di digiuno, da cibo e da acqua.

ASPETTO ESTERNO

- 0 - Normale. Pelo liscio e lucido, occhi chiari e lucenti.
- 1 - Mancanza di pulizia, ma non altri segni marcati.
- 2 - Pelo irto, epifora e scolo nasale.
- 3 - Pelo molto irto, perineo non pulito, odore urinoso, postura anormale (ad es. falsa cifosi), occhi lucidi, midriasi.

SEGNI CLINICI

- 0 - Temperatura corporea e frequenza respiratoria e cardiaca nella norma, così come per le mucose e le aree non pigmentate.
- 1 - Piccole alterazioni.
- 2 - Temperatura corporea alterata di un grado e frequenza cardiaca e respiratoria elevate sino al 30% rispetto al controllo.
- 3 - Alterazione della temperatura cardiaca ($\pm 2C^\circ$), aumento di più del 50% oppure marcata riduzione della frequenza cardiaca e respiratoria, con respirazione superficiale.

COMPORTEAMENTO SPONTANEO

- 0 - Normale.
- 1 - Piccoli cambiamenti.
- 2 - Anormale. Meno mobile e vigile del normale. Isolamento dal gruppo, inattività notturna.
- 3 - Vocalizzazioni non sollecitate, automutilazioni, grugniti espiratori.

COMPORTEAMENTO DI RISPOSTA AGLI STIMOLI

- 0 - Normale per le condizioni.
- 1 - Limitata depressione o esagerazione della risposta.
- 2 - Segni moderati di risposta anormale.
- 3 - Reazione violenta o debole risposta muscolare come in stato precomatoso.

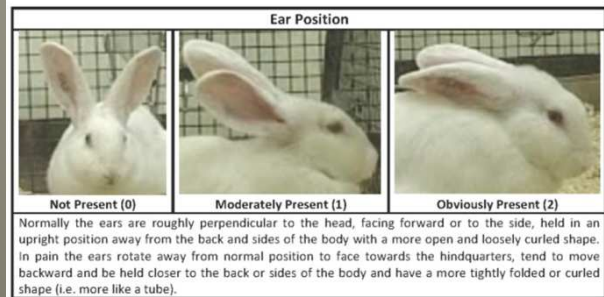
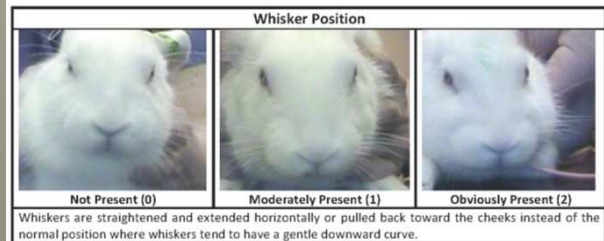
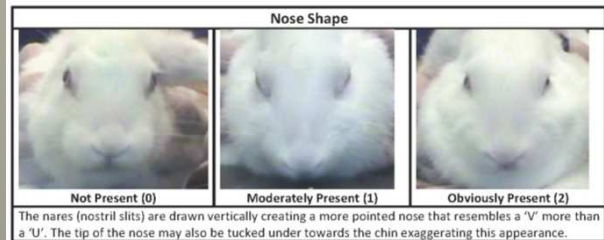
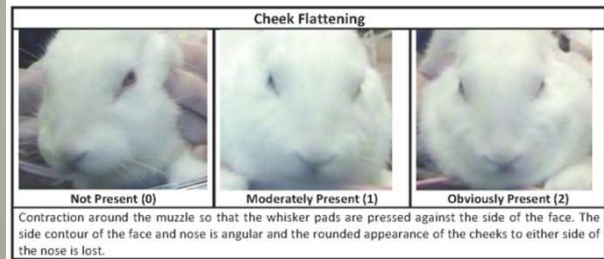
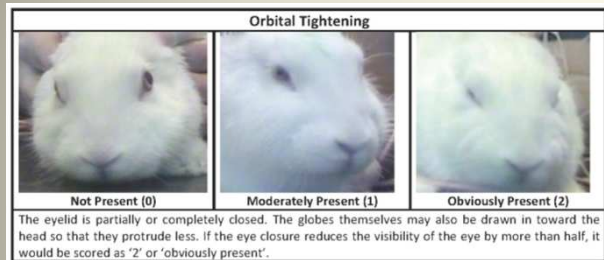
Tabella 2 - Interpretazione dei punteggi totali ottenuti nella valutazione del dolore degli animali da laboratorio. (modificata da Morton e Griffiths, 1985)

- 0-4 Normale.
- 5-9 Attento monitoraggio. Considerare l'impiego di analgesici e sedativi.
- 10-14 Ampia evidenza di sofferenza. Considerare seriamente l'impiego di analgesici. Necessita di un'osservazione regolare. Considerare l'opportunità di interruzione dell'esperimento.
- 15-20 Somministrare analgesici eccetto che in stato comatoso. Evidente stato di grave dolore. Se è probabile che tale stato perduri, interrompere la sperimentazione.

Segni di dolore e di stress associati alle procedure sperimentali

| SEGNII LIEVI | SEGNII MODERATI | SEGNII GRAVI |
|---|---|--|
| Ridotta perdita di peso | Perdita di peso superiore al 20% | Perdita di peso superiore al 25% |
| Consumo di acqua e cibo tra il 40-75% del normale utilizzo in 72h | Consumo di acqua e cibo al di sotto del normale 40% in 72h | Consumo di acqua e cibo inferiore al 40% per 7 giorni, o anoressia per 72h |
| Piloerezione parziale | Mantello aruffato-marcata piloerezione | Mantello aruffato-marcata piloerezione - segni di distrazione a livello della cute |
| Animale sottomesso ma recettivo, risponde agli stimoli con un normale pattern comportamentale | Animale sottomesso, mostra un pattern comportamentale alterato in risposta agli stimoli | Assenza di risposta alle sollecitazioni ed agli stimoli esterni |
| Interagisce con i conspecifici | Scarsa interazione con i conspecifici | Assenza di interazione con i conspecifici |
| Postura alterata dopo trattamento | Postura spesso alterata | Postura persistentemente alterata |
| Lamenti transitori | Lamenti intermittenti a seguito di stimoli | Lamenti anche in assenza di stimoli |
| Scolo oculo-nasale transitorio | Scolo oculo-nasale persistente | Scolo oculo-nasale persistente ed abbondante |
| Respirazione normale | Frequenza respiratoria spesso anormale | Respirazione faticosa |
| Tremori transitori | Tremori intermittenti | Tremori persistenti |
| Assenza di convulsioni | Convulsioni frequenti | Convulsioni continue |
| Assenza dello stato di abbandono | Stato di abbandono momentaneo (<1h) | Stato di abbandono prolungato (>1h) |
| Assenza di automutilazioni | Assenza di automutilazioni | Automutilazioni |

| Manifestazione clinica | Pain score |
|--|------------|
| Pelo normale, mucose normali, normale attività fisica, normale consumo di cibo ed acqua | 0 |
| Arruffamento del pelo (piloerezione, lesioni, disidratazione) | 1 |
| Arruffamento del pelo, < attività fisica (<i>grooming</i> , esplorazione...) | 2 |
| Arruffamento del pelo, < attività fisica (letargia), *perdita di peso < 10 % | 3 |
| Arruffamento del pelo, letargia, *perdita di peso < 10% , difficoltà respiratoria (dispnea, tachipnea) | 4 |
| Arruffamento del pelo, letargia, *perdita di peso tra 10 e 20% , dispnea/tachipnea, lordosi/cifosi | 5 |
| Arruffamento del pelo, letargia, dispnea/tachipnea, lordosi/cifosi, *perdita di peso > 20% | 6 |



The Rabbit Grimace Scale with images and explanations for each of the 5 facial action units (FAU); orbital tightening, cheek flattening, nose shape, whisker position and ear position. Each FAU is scored according to whether it is not present (score of 0), moderately present (score of 1) and obviously present (score of 2).

Not present
0



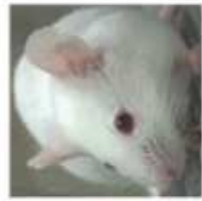
Moderate
1



Severe
2



Orbital tightening



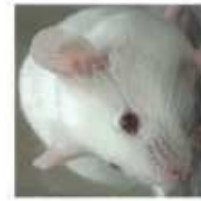
Nose bulge



Cheek bulge



Ear position



Whisker change

Not present
"0"



Moderate
"1"



Obvious
"2"



Orbital Tightening



Nose/Cheek Flattening



Ear Changes



Whisker Change

EFFICACIA DI NUOVI AGENTI FARMACOLOGICI SULLA CRESCITA TUMORALE (Working document on a severity assessment framework)

| Quali interventi devono essere effettuati sugli animali utilizzati in questo studio? | Ché cosa proveranno gli animali? Quanta sofferenza potrebbero provocare le procedure? Ché cosa potrebbe aggravare la sofferenza? | In che modo verrà ridotta al minimo la sofferenza? | |
|--|---|--|---|
| | Effetti avversi | Metodologia e interventi | Punto finale umanitario |
| Mantenimento di topi immunocompromessi | Gli animali sono soggetti a infezioni | Animali stabulati in gabbie IVG e sottoposti a pratiche di gestione mirate per ridurre al minimo il rischio di contaminazione. Animali stabulati in gruppi e dotati di materiale di arricchimento ambientale per ridurre lo stress. Le modalità di gestione e di cura saranno modificate qualora siano osservati segni di distress, aggressione o comportamenti anormali. | Sarà soppresso qualsiasi animale che mostri segni di malattia intercorrente |
| Iniezione sottocutanea di cellule tumorali | Disagio transitorio a seguito dell'iniezione | L'iniezione verrà effettuata una sola volta Verrà iniettata la dose adeguata | Gli animali saranno soppressi con metodi umanitari se verranno osservati segni di distress o disagio più |
| | | (massimo 0,2ml). Gli animali saranno sottoposti ad assiduo monitoraggio nel periodo immediatamente successivo all'iniezione. | che lievi, senza recupero rapido, a seguito dell'iniezione (eventualità molto rara). |
| Crescita del tumore | Può provocare disagio o alterare il comportamento o la locomozione normali. Il tumore può infettarsi o ulcerarsi (ma non dovrebbe dare metastasi) | Osservazione quotidiana degli animali, monitoraggio periodico delle condizioni generali di salute e della crescita del tumore Il piano di monitoraggio comprenderà l'osservazione attenta della postura, della locomozione e delle dimensioni e stato del tumore. Gli interventi farmacologici inizieranno quando il tumore raggiungerà 0,5 cm di diametro (misurato con compassi elettronici) | L'animale verrà soppresso in caso di ulcerazione del tumore, se il tumore interferisce con il comportamento, la postura o la locomozione normali o se le dimensioni del tumore supereranno 1,2 cm di diametro (Workman et al. 2010) |
| Iniezione intraperitoneale di un agente farmacologico nuovo | Disagio transitorio a seguito dell'iniezione. I farmaci citotossici possono provocare diarrea, calo ponderale, anoressia o letargia | Gli animali saranno sottoposti ad assiduo monitoraggio nel periodo immediatamente successivo all'iniezione. Dose massima di 10ml/kg al giorno per 7 giorni. Verranno utilizzati livelli di dosaggio minimi (stabiliti sulla base di studi volti a determinare i dosaggi) Per valutare il benessere sarà utilizzato il quadro di valutazione clinica | Gli animali saranno soppressi se il calo ponderale supererà il 20% del peso corporeo iniziale. Saranno soppressi gli animali che non mangiano o con diarrea per un periodo superiore a 48 ore. Come punto finale umanitario verrà fissato un limite massimo del punteggio clinico. |

Esempi di sistemi di valutazione clinica

| Aspetto | Punteggio |
|---|-----------|
| Peso corporeo | |
| Calo ponderale 5-10% | 1 |
| Calo ponderale 11-15% | 2 |
| Calo ponderale 16-20% | 3 |
| Calo ponderale 20% + | HEP |
| Stato del mantello | |
| Mantello lievemente arruffato | 1 |
| Piloerezione lieve | 2 |
| Piloerezione marcata | 3 |
| Funzioni corporee | |
| Tachipnea (respirazione accelerata) | 1 |
| Dispnea (respirazione difficoltosa) | 3 |
| Ambiente | |
| Feci molli o diarrea | 1 |
| Diarrea con sangue | HEP |
| Comportamento | |
| Teso e nervoso alla manipolazione | 1 |
| Distress marcato alla manipolazione, ad es. tremore, vocalizzazione, aggressività | 3 |
| Locomozione | |
| Locomozione /postura lievemente anormali | 1 |
| Locomozione /postura marcatamente anormali | 2 |
| Significativi problemi di mobilità /Riluttanza a muoversi | 3 |
| Immobilità >24h | HEP |
| Indicatori specifici della procedura | |
| Dimensioni tumore >1,2cm | HEP |
| Ulcerazione del tumore | HEP |
| Tumore che impedisce il movimento | HEP |

Interventi

| Punteggio | Interventi |
|-----------|---|
| 1 | Rivedere la frequenza del monitoraggio |
| 2 | Valutare la possibilità di somministrare cure supplementari, ad es. dose extra di liquidi |
| 4 | Consultare il veterinario |
| 6 | Attuare punto finale umanitario |

Esempio di scheda di valutazione

| | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|
| Animale n. | | | | |
| Data | 01/06 | 02/06 | 03/06 | 04/06 |
| Aspetto | | | | |
| Peso corporeo | | | | |
| Stato del mantello | | | | |
| Funzioni corporee | | | | |
| Dispnea e/o tachipnea | | | | |
| Assunzione di cibo | | | | |
| Ambiente | | | | |
| Feci molli o diarrea | | | | |
| Diarrea con sangue | | | | |
| Comportamenti | | | | |
| Manipolazione | | | | |
| Aggressione | | | | |
| Locomozione anormale | | | | |
| Postura anormale | | | | |
| Riluttanza a muoversi | | | | |
| Indicatori specifici relativi alla procedura | | | | |
| Dimensioni tumore | | | | |
| Ulcerazione del tumore | | | | |
| Tumore che impedisce il movimento | | | | |
| Punteggio totale | | | | |
| Altre osservazioni | | | | |

ARTRITE (Working document on a severity assessment framework)

| Quali interventi devono essere effettuati sugli animali utilizzati in questo studio? | <p>Che cosa proveranno gli animali? Quanta sofferenza potrebbero provocare le procedure? Che cosa potrebbe aggravare la sofferenza?</p> <p>Effetti avversi</p> | In che modo verrà ridotta al minimo la sofferenza | |
|--|--|---|--|
| | | Metodologia e interventi | Punto finale |
| <p>Iniezione sottocutanea di collagene bovino di tipo II in adiuvante incompleto di Freund (FIA) eseguita alla base della coda per un massimo di tre volte</p> | <p>Stress da contenimento. Dolore transitorio, gonfiore moderato nel sito dell'iniezione e disagio per uno – due giorni. Ulcerazione cutanea possibile ma molto improbabile con FIA.</p> | <p>Atteggiamenti empatici e manipolazione competente per tutta la durata delle procedure. Le formulazioni e dosi standardizzate saranno selezionate in modo da ridurre al minimo il gonfiore e il dolore.</p> | <p>Se l'ulcerazione cutanea persisterà o si infetterà, gli animali saranno soppressi con metodi umanitari</p> |
| <p>Sviluppo di artrite (G0-G10)</p> | <p>Disagio, dolore, disabilità e distress; gli animali possono mostrare segni di decadimento delle condizioni fisiche quali aspetto abbattuto, inappetenza, riluttanza a muoversi, calo ponderale, gonfiore delle articolazioni, vocalizzazioni udibili alla manipolazione</p> | <p>Monitoraggio clinico assiduo utilizzando una scheda di valutazione clinica generale, con maggiore frequenza del monitoraggio all'insorgenza di segni clinici (di solito a partire all'incirca da G 8 – G 10). Per tutta la durata dello studio aggiunta di lettiera morbida e materiale morbido per i nidi. Per tutta la durata dello studio accesso facilitato all'acqua e al cibo (ad es. collocati sul pavimento della gabbia). Uso di un sistema di classificazione clinica dell'artrite che valuta il grado di gonfiore e il numero delle articolazioni colpite.</p> | <p>Gli animali saranno soppressi con metodi umanitari al raggiungimento dei punteggi clinici predeterminati per i punti finali umanitari (v. tabella riportata di seguito)</p> |
| <p>Somministrazione di agenti farmacologici (test e controllo, due volte al giorno) per via sottocutanea o intraperitoneale (dal G 10 al G 24)</p> | <p>Disagio transitorio dopo l'iniezione. In base ai precedenti dati sugli animali, non si prevede che gli agenti farmacologici provochino effetti avversi.</p> | <p>Attento monitoraggio quotidiano utilizzando una scheda di valutazione clinica generale</p> | <p>Saranno applicati punti finali umanitari in caso di effetti avversi significativi</p> |
| <p>Valutazione degli effetti degli agenti farmacologici sulla gravità dell'artrite (G 0, G 10, G 13, G 16, G 20 e G 24)</p> | <p>A seconda dei metodi impiegati può verificarsi qualche ulteriore dolore o disagio transitorio, dovuti ad es. all'uso dei filamenti di Von Frey, l'uso di compassi elettronici o le necessità di manipolazione.</p> | <p>Attento monitoraggio clinico Riduzione della frequenza del monitoraggio (al minimo coerentemente con gli obiettivi scientifici) fino a recupero dell'animale</p> | <p>V. tabella riportata di seguito</p> |

Tabella 1. Sistema di valutazione degli indicatori utilizzati nella scheda di valutazione clinica

| Aspetto | Punteggio |
|---|-----------|
| Calo ponderale normale < 5% | 0 |
| Calo ponderale 5-10% | 1 |
| Calo ponderale 11-15% | 2 |
| Calo ponderale 16-20% | 3 |
| Calo ponderale 20% + | HEP |
| Assenza di grooming | 1 |
| Cute avvizzita /disidratazione | 1 |
| Funzioni corporee | |
| Dispnea | 2 |
| Tachipnea | 1 |
| Comportamento | |
| Riluttanza a muoversi | 1 |
| Letargia/apatia | 2 |
| Immobilità persistente < 24h | 3 |
| Immobilità >24h | HEP |
| Vocalizzazione alla manipolazione | 1 |
| Vocalizzazione, animale teso e nervoso alla manipolazione | 2 |
| Vocalizzazione al movimento/spontanea | 3 |
| Indicatore specifico relativo alla procedura | |
| Punteggio zampa artritica (Tabella 2) | 0-8 |

Tabella 2. Indicatore specifico relativo alla procedura: punteggio zampa artritica

| | |
|---|--|
| 0 | Normale |
| 1 | Eritema e gonfiore a carico di una caviglia |
| 2 | Eritema e gonfiore a carico della caviglia e della metà prossimale delle articolazioni tarsali |
| 3 | Eritema e gonfiore a carico della caviglia e di tutte le articolazioni tarsali fino alle articolazioni metatarsali |
| 4 | Eritema e gonfiore a carico dell'intera zampa, incluse le dita |

Esempi di interventi appropriati in risposta ai punteggi clinici totali

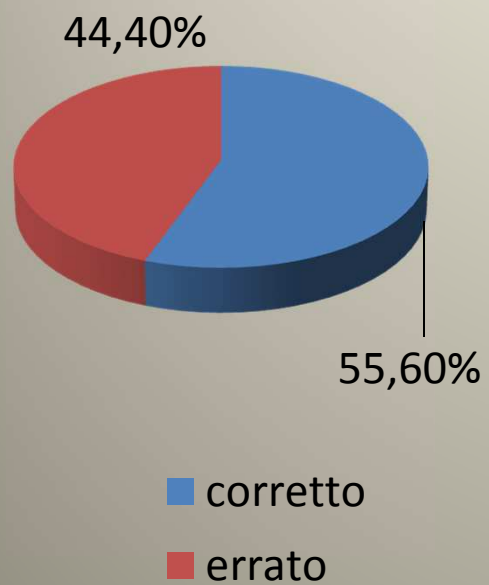
| Interventi | Punteggio totale |
|--|------------------|
| Intensificare la frequenza del monitoraggio, valutare la possibilità di somministrare liquidi/cure supplementari | ≥4 |
| Valutare l'andamento con il veterinario | 5-15 |
| Punto finale umanitario | ≥16 |

Valutazione del livello di gravità: esempio di analisi su 1134 richieste di VTS

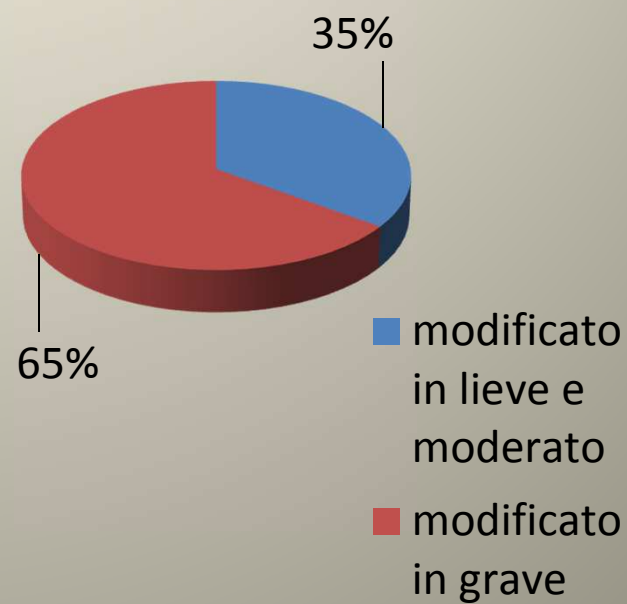
| Corretta | nr. | % | Errata | | nr. | % | %Errore |
|---------------|------------|--------------|----------------------|---------------|------------|--------------|--|
| | | | Indicato | Autorizzato | | | |
| Lieve | 162 | 14,2% | Lieve | | 247 | 21,8% | 49,2%* |
| | | | | Moderato | 160 | 14% | |
| | | | | Grave | 84 | 7,4% | |
| | | | | Non risveglio | 3 | 0,2% | |
| Moderato | 241 | 21,2% | Moderato | | 246 | 21,8% | 49,2%* |
| | | | | Grave | 246 | 21,6% | |
| Non risveglio | 73 | 6,4% | Non risveglio | | 8 | 0,8% | 1,6%* |
| | | | | Lieve | 2 | 0,17% | |
| | | | | Moderato | 2 | 0,17% | |
| | | | | Grave | 4 | 0,36% | |
| Grave | 157 | 13,8% | | | | | * margine di errore nella categoria considerata |
| Totale | 633 | 55,6% | | Totale | 501 | 44,4% | |

Livello gravità

Livelli gravità indicati



Livelli gravità modificati



2. Titolo del progetto di ricerca: Validazione della proteina Citron kinase come target farmacologico per la cura del medulloblastoma.

I topi delle coorti di studio e di controllo verranno sottoposti ad iniezione intraperitoneale di Tamoxifene (75 mg/kg di peso corporeo) ai tempi un mese, due mesi, o tre mesi dopo la nascita. I topi che avranno raggiunto l'end point sperimentale considerato (quattro mesi di vita oppure la comparsa dei primi disturbi atassici), verranno sacrificati mediante dislocazione cervicale, attuata circa cinque minuti dopo l'iniezione intraperitoneale di una miscela anestetica costituita da xilazina (Rompun:75 mg/kg di peso corporeo) e da tiletamina/zolazepam (Zoletil: 20 mg/kg di peso corporeo). Per analisi di western blot o di qPCR i tessuti

24. Effetti avversi e misure per ridurre, evitare ed attenuare qualsiasi forma di sofferenza per l'animale dalla nascita alla morte

Descrivere i potenziali effetti negativi che la procedura può determinare sull'animale (es. dolore, stress, perdita di peso, febbre, anemia, deficit neurologici, comportamenti anomali o altri sintomi clinici di stress acuto o cronico o deficienze nutrizionali).

Indicare se questi effetti possono essere ridotti e/o annullati con la somministrazione di analgesici o altri farmaci e in caso contrario, indicare perché ciò non è possibile.

Il grado di sofferenza degli esperimenti proposti in questo progetto dipende principalmente dalla comparsa e dall'aggravamento della sintomatologia neurologica, causati dallo sviluppo dei medulloblastomi cerebrallari. Tale sintomatologia si rileva in genere dopo il quarto mese postnatale. In ogni caso, per limitare al massimo le sofferenze degli animali, questi verranno osservati quotidianamente dal terzo mese sia nelle coorti con end point al quarto mese, sia in quelle con end point alla comparsa della sintomatologia neurologica. Al fine di limitare al minimo le sofferenze, la comparsa di atassia determinerà in ogni caso la soppressione degli animali.

26. Proposta di classificazione della gravità delle procedure ai sensi dell'articolo 15 e Allegato VII

XNon risveglio

Lievi

Moderate

Gravi

**PROTOCOLLO PER L'IMPIEGO DEGLI ANIMALI IN SPERIMENTAZIONE
DECRETO LEGISLATIVO 4 marzo 2014, n. 26 art. 31**

1. Utilizzatore

[REDACTED]

2. Titolo del progetto di ricerca

Neuroplasticità indotta dall'allenamento motorio di resistenza e di coordinazione nel topo normale e in modelli murini di malattie neuromuscolari. Analisi delle modificazioni della corteccia sensorimotoria e dell'ippocampo

16. Obiettivi del progetto di ricerca

Studiare nei topi wild-type (WT), tramite test comportamentali ed indagini neuroanatomiche, gli effetti morfo-funzionali di due diverse tipologie di allenamento motorio (di resistenza e di coordinazione) nella corteccia motoria e nella formazione ippocampale, ed eventualmente in altre regioni del sistema nervoso centrale (SNC). Studiare e confrontare nei modelli murini (mdx, hSOD1(G93A)), tramite test comportamentali ed indagini neuroanatomiche, gli effetti morfo-funzionali dell'allenamento di resistenza e di coordinazione nelle varie regioni del SNC. Descrivere quindi le eventuali differenze nelle modificazioni strutturali e funzionali della corteccia motoria, della formazione ippocampale, ed eventualmente in altre regioni del SNC, nei modelli murini di patologie neuromuscolari (distrofia muscolare di Duchenne, DMD, e sclerosi laterale amiotrofica, SLA)

Produrre dati potenzialmente rilevanti che permettano di trasferire le acquisizioni dal progetto di ricerca all'indagine sull'uomo, al fine di **approfondire le conoscenze sul ruolo terapeutico-riabilitativo dei differenti paradigmi di allenamento-esercizio in soggetti con patologie del sistema motorio (ad esempio DMD, SLA)**

Il protocollo di nuoto prevede una fase iniziale di ambientamento. In questo caso, il protocollo d'allenamento è stato sviluppato a partire dai modelli procedurali proposti da Tanaka e collaboratori nel 2003 e da Chen e collaboratori nel 2009 (Tanaka e coll., 2003; Chen e coll., 2009). Per aumentare il carico di lavoro ed evitare fenomeni di galleggiamento passivo, nella vasca preposta allo swimming, verrà generata una flusso di acqua a differenti intensità (flow rate). Un ulteriore sottogruppo di questi animali sarà invece allenato su dispositivo per corsa, in modo da creare dati di confronto fra queste tipologie di allenamento di resistenza.

Il gruppo "coordinazione" verrà invece sottoposto ad un protocollo allenante che consiste in un compito acrobatico. Ogni topo dovrà attraversare un percorso ad ostacoli, composto da vari elementi, fra cui ponti stretti, scalette, corde ed ostacoli instabili. I primi due giorni saranno utilizzati per creare una fase di adattamento al circuito. Il tempo per attraversare ogni ostacolo per ogni prova verrà registrato (Kleim e coll., 2007). Un sottogruppo di questi animali sarà invece allenato con un altro compito motorio, quale ad esempio il rotarod o lo staircase test, per creare dati di confronto fra queste tipologie di allenamento di coordinazione.

I differenti gruppi sperimentali saranno valutati alla fine del protocollo tramite test comportamentali, fra cui i seguenti mirati a valutare:

- L'apprendimento spaziale (Morris Water Maze, Barnes Maze);
- La resistenza alla fatica (vedi Tanaka e coll., 2003);
- La forza massima;
- La frequenza di bracciata.

Per valutare la resistenza alla fatica e la frequenza di bracciata prendiamo spunto da setup già utilizzati in Matsumoto e coll., 1996, Tanaka e coll., 2003, e Minegishi e coll., 2011.

Durante il test di resistenza il topo viene posto nella vasca e nuota fino ad esaurimento. In questo caso il test si conclude quando il topo assume una postura perpendicolare rispetto alla superficie dell'acqua e non riesce a tenere la testa fuori dall'acqua, indice di fatica in

24. Effetti avversi e misure per ridurre, evitare ed attenuare qualsiasi forma di sofferenza per l'animale dalla nascita alla morte

Descrivere i potenziali effetti negativi che la procedura può determinare sull'animale (es. dolore, stress, perdita di peso, febbre, anemia, deficit neurologici, comportamenti anomali o altri sintomi clinici di stress acuto o cronico o deficienze nutrizionali).

Il progetto di ricerca presenta un carattere interventistico prevalentemente non invasivo, tuttavia l'allenamento di resistenza può indurre, come nell'uomo, un certo grado di stress. Le indagini neuroanatomiche richiedono un intervento invasivo, fra cui l'iniezione di un tracciante neuronale (BDA). Questa procedura è effettuata in anestesia totale e gli animali non mostrano segni evidenti di sofferenza al risveglio. La soppressione degli animali avviene per overdose da anestetico.

Indicare se questi effetti possono essere ridotti e/o annullati con la somministrazione di analgesici o di altri farmaci e, in caso contrario, indicare perché ciò non è possibile.

Per ridurre lo stress indotto dall'allenamento di resistenza, peraltro transiente e lieve, non è previsto l'utilizzo di farmaci, in quanto il loro uso potrebbe alterare i dati relativi agli esperimenti comportamentali e neuroanatomici.

Inoltre il protocollo di allenamento sarà somministrato con carico crescente in modo da favorire un adattamento graduale. Fra una sessione di allenamento e la successiva ogni soggetto avrà a disposizione un adeguato periodo di riposo. Il peso sarà monitorato in ogni animale per valutare eventuali variazioni legate al genotipo e/o alle procedure qui descritte.

26. Proposta di classificazione della gravità delle procedure ai sensi dell'articolo 15

e

Allegato VII

Non risveglio

Lievi X

Moderate

Gravi

Oggetto: **Richiesta di approvazione del progetto di ricerca dal titolo:**

STUDIO DELLE MODIFICAZIONI STRUTTURALI E FUNZIONALI DELL'IPPOCAMPO DI RATTO IN SEGUITO A EPILESSIA: EFFETTI DELL'ALFA-TOCOFEROLO

21. METODOLOGIA E TECNICA DELL'ESPERIMENTO *(Va spiegato dettagliatamente il protocollo sperimentale con particolare riferimento alle fasi che prevedono manipolazione degli animali, frequenza, tipo di trattamenti, prelievi, ecc.).*

Per lo svolgimento di questo studio saranno utilizzati ratti maschi adulti di ceppo Sprague Dawley di 250-350 gr di peso corporeo (totale n = 180). Gli animali saranno casualmente divisi in due gruppi.

1) Controlli;

2) Trattati per l'induzione dello *status epilepticus* (SE) tramite somministrazione intraperitoneale di acido kainico (15 mg/Kg b.w.) come agente pro-convulsivante.

I ratti appartenenti ai gruppi sopra riportati saranno ulteriormente suddivisi in due sottogruppi ognuno, come segue:

26. PROPOSTA DI CLASSIFICAZIONE DELLA GRAVITA' DELLE PROCEDURE

(ai sensi dell'art. 15 e dell'allegato VII)

| | | |
|---|---|--|
| | NON RISVEGLIO | |
| X | LIEVI <i>Specificare quali sofferenze</i> | - Unica somministrazione intraperitoneale acido kainico che induce una crisi convulsiva generalizzata - Somministrazioni ripetute intraperitoneali di alfa-tocoferolo o suo veicolo con effetti avversi nulli |
| | MODERATE <i>Specificare quali sofferenze</i> | |
| | GRAVI <i>Specificare quali sofferenze</i> | |

Bibliografia

- Comunità Europea del 18.12.86 Direttiva del Consiglio del 24 novembre 1986 concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri relative alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o altri fini scientifici. *G.U della Comunità Europea 18.12.1986.*
- D. L. vo 27 gennaio 1992, n.116 Attuazione della Direttiva n.86/609/CEE in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o altri fini scientifici. *Supplemento Ordinario G.U. Serie Generale n.40, 18.2.1992.*
- Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. *G.U. Unione Europea L.276/33, 20.10.2010.*
- D. L.vo 4 marzo 2014, n.26 Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. *G.U. Serie Generale n.61, 14.3.2010.*
- E. Carstens and Gary P. Moberg, Recognizing Pain and Distress in Laboratory Animals, *ILAR Journal*, Vol.41, 2, 2000
- Working document on a severity assessment framework National Competent Authorities for the implementation of Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. Brussels 11 – 12 July 2012
- Corrigendum of 24 January 2013 - Working document on genetically altered animals. National Competent Authorities for the implementation of Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. Brussels, 23-24 January 2013
- *Wolfensohn S., Lloyd M.* Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare. January 2013, Wiley.