



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# Metodi di manipolazione e contenimento degli animali, tecniche di prelievo (sangue, feci ed urine) e somministrazione di sostanze

**Luca Lorenzini**

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie

# MANIPOLAZIONE

Scegliere tecnica:

- più sicura per l'operatore
- più sicura per l'animale



Sia topo che ratto possono essere sollevati dalla **BASE** della coda e **MAI** dalla punta

È una tecnica che può essere utilizzata per le manovre più semplici come ad esempio spostare l'animale in una gabbia diversa  
L'animale deve rimanere sospeso per il minor tempo possibile



**CORRETTO**



**NON DEL TUTTO CORRETTO**

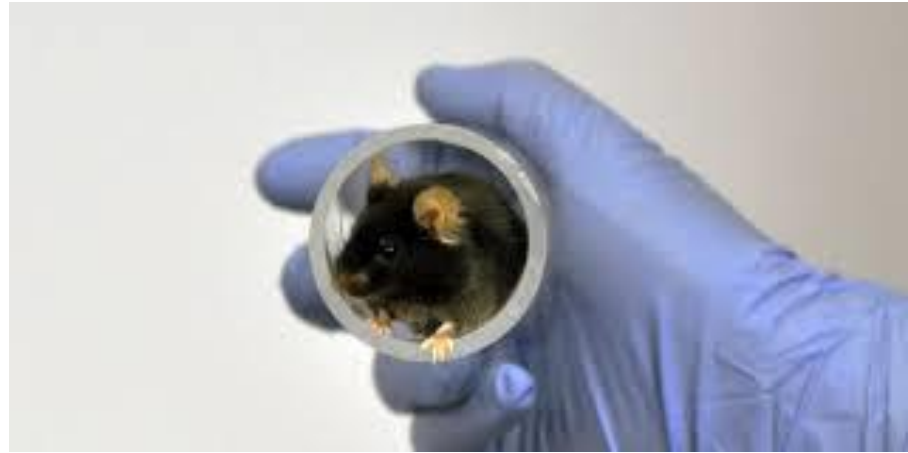


**SBAGLIATO!!!!**

Per evidenti questioni di peso, nel ratto valgono le stesse identiche regole dette ma con maggior enfasi

RISCHIO MAGGIORE DI **DEGLOVING**



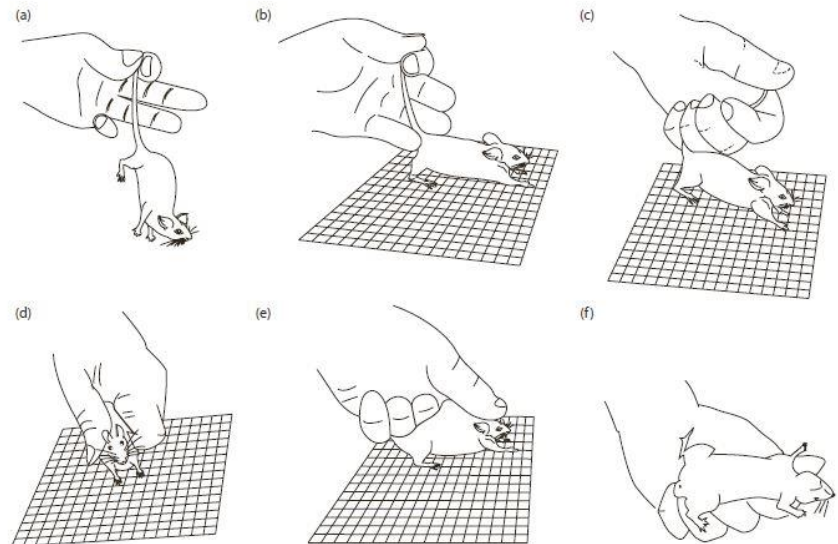




# TOPO

## Sistema One hand

1. Sollevare il topo dalla base della coda e lo si posiziona sul coperchio della gabbia o su una superficie ruvida
2. Quale mano usare?
3. Infilare la base della coda tra il 3° e 4° dito mentre delicatamente si tira indietro la coda. Questo, per riflesso, porterà il topo ad afferrare la griglia con tutte e quattro le zampe e tirare in avanti.
4. Afferrare saldamente il topo per la collottola con la stessa mano che trattiene la coda. Afferrare cute e sottocute con l'indice e il pollice all'altezza della base della testa ed estendere la presa lungo la schiena incorporando il medio. Assicurarsi di applicare una pressione sufficiente, che mantenga il topo fermo nel controllo ma di non tirare la pelle a livello di gola impedendo all'animale di respirare.
5. Fare attenzione alla testa, perché il topo non deve poterla muovere (e mordere!) ma anche di osservare le mucose in caso di cianosi...



# TOPO



## Uso dei coni flessibili

Il cono può essere acquistato o fatto in casa con un foglio flessibile di plastica sottile arrotolato a cui applicare un foro alla estremità che accoglierà la testa dell'animale. Il foro deve essere abbastanza piccolo da consentire al topo o ratto di far passare il naso ma non il resto del corpo.

Una volta entrato correttamente si tiene chiusa l'estremità opposta

**VANTAGGI:** ottimo contenimento, con alcuni accorgimenti aumenta la facilità di ingresso (effetto tana), annulla il rischio di soffocamento, la plastica sottile e trasparente consente iniezioni o altri trattamenti locali.

**SVANTAGGI:** poca o nulla traspirazione e conseguente rischio di surriscaldamento. Si perde il «contatto» con l'animale

## CONSIGLIO:

Usare per il minimo tempo necessario.

Valutare (per ratto) di usare un telo arrotolato



## Uso dei Restrainer

Principalmente usati quando si deve utilizzare un accesso venoso dalla coda

Possono essere acquistati commercialmente o fatti in laboratorio.

La taglia deve essere appropriata per evitare che gli animali si possano muovere o girarsi

Anche per questo sistema è bene ridurre al minimo il tempo per evitare eccessivo stress o surriscaldamento.



Gli animali possono essere trattenuti anche usando piccoli teli in cui avvolgerli o semplicemente tenendo una mano sopra l'animale.

Le tecniche possono essere adattate per soddisfare le esigenze dell'animale e del lavoratore.

Prestare sempre attenzione per evitare morsi e graffi o il **rilascio accidentale dell'animale con possibili cadute dall'alto**



# RATTO

## Scruffing o presa per la collottola

1. La presa viene generalmente eseguita a due mani e solo in ratti più piccoli (intorno ai 100-125 grammi). Non è la tecnica da preferire perché i ratti sono meno idonei a questa presa rispetto ai topi, ma può essere comunque utile in alcune situazioni.
2. Come per il topo si afferra la coda e si tira l'animale delicatamente all'indietro. Prestare molta attenzione ad afferrare vicino alla base della coda,
3. Tenendo saldamente la coda nella mano si avvicina dal retro (NON DAL MUSO) l'altra mano e si afferra la collottola  
Ad esempio, se la coda del topo si trova nella mano sinistra dei conduttori, non avvicinarti al ratto dal naso per scuoterlo con la mano destra. Invece, prendi la mano sinistra e avvicinati alla collottola da dietro, come per il topo.



## CrissCross o incrociata

1. Si afferra il ratto per la coda con una mano e si tira delicatamente all'indietro su una superficie ruvida (come descritto sopra per i topi)
2. Si posiziona l'altra mano sulla schiena del topo, avvicinandosi dal retro.
3. Si afferrare con pollice e indice la gabbia toracica facendo scivolare le dita in avanti, sotto le scapole.
4. Gli «avambracci» del ratto devono essere quindi delicatamente sollevati con il pollice e indice spingendo in avanti in modo che si incrocino sotto il muso dell'animale, impedendogli di mordere.
5. Il ratto può essere tenuto in questo modo con una mano sola ma il corpo andrebbe «stabilizzato» contro l'operatore → evitare di tenere l'animale sospeso!.



# RATTO

T-Rex Grip o «zainetto»

- 1: Si afferra il ratto per la coda con la mano dominante e si tira delicatamente all'indietro (come descritto sopra per i topi).
2. Si posiziona l'altra mano sulla schiena del topo, avvicinandosi da dietro
3. Si afferra il ratto attorno al torace con l'anulare, il mignolo e il pollice, mentre indice e medio circondano la testa dell'animale. La punta del medio e del pollice dovrebbero toccarsi, senza tuttavia comprimere il torace.
4. Il ratto può essere tenuto in questo modo con una mano sola ma il corpo andrebbe «stabilizzato» contro l'operatore → evitare di tenere l'animale sospeso!.





# SOMMINISTRAZIONE INTRAMUSCOLO



## Scelta della via di somministrazione e preparazione della zona

La via intramuscolo nel topo non è raccomandata dato che il muscolo è molto piccolo e piccoli volumi possono risultare molto dolorosi. Altre vie quali intradermiche, zone come la pianta del piede o intraspleniche non sono accettabili se non con scientificamente risultanti come assolutamente necessarie

Il sito di iniezione andrebbe sempre rasato e disinfettato, con soluzioni alcoliche o disinfettanti. In alcuni casi può essere utile o opportuno utilizzare nel sito di iniezione creme anestetiche.

## Preparazione delle soluzioni

Usare soluzioni ovviamente sterili (filtrazione 0,22 micron). Scegliere un veicolo o solvente adatto:

- soluzioni fisiologica (NaCl 0,9%) (acqua in sottocute può essere dolorosa mentre in endovena provoca emolisi)
- Acqua a soluzione con fino 50% di glicole polietilenico
- Acqua a soluzione con non oltre 10% di Tween 80
- Acqua e methylcellulosa al massimo 0,25%
- Corn or vegetable oil (orale)
- PBS o medium di coltura
- Possono essere usati solventi con basse percentuali di alcoli, glicole o acetone



# SOMMINISTRAZIONE



## Preparazione delle soluzioni

Temperatura ambiente o addirittura a temperatura corporea

## PH delle soluzioni

Generalmente si considera un range di tolleranza da 4,5-8,0

Per le somministrazioni orali si può arrivare a 3. Le soluzioni alcaline sono sempre peggio tollerate

Chiaramente le vie preferenziali per soluzioni di range ancora più estremi è sempre la via endovenosa per il potere tampone del sangue (attenzione però a non uscire dal vaso!)

## Volume e frequenza

Preferibili bassi volumi. Ricordo che le soluzioni date per endovena possono indurre ad edema polmonare mentre iniezioni effettuate troppo velocemente portare ad arresto cardiaco



# VOLUMI E ATTREZZATURE



	Mouse		Rat	
Route	Recommended volume	Recommended gauge and length of needle	Recommended volume	Recommended gauge and length of needle
Intranasal <sup>1</sup>	5-25 $\mu$ l	N/A	5-25 $\mu$ l	N/A
Intramuscular <sup>1,2</sup>	0.00005 ml/g	<23 g, 0.5 to 0.75 in	0.1 ml/kg	<21 g, 0.5 to 0.75 in
Intraperitoneal <sup>1,2</sup>	0.02 ml/g	<21 g, 0.75 to 1 in	10 ml/kg	<21 g, 0.75 to 1 in
Subcutaneous <sup>1,2</sup>	0.01 ml/g	<22 g, 0.5 to 1 in	5 ml/kg	<22 g, 0.5 to 1 in
Intradermal <sup>1</sup>	0.05-0.1 ml	<26 g, 0.5 in	0.05-0.1 ml	<26 g, 0.5 in
Intravenous <sup>1,2</sup>	0.005 ml/g -0.025 ml/g*	<25 g, 0.75 to 1 in	5 ml/kg-20 ml/kg*	<23 g, 0.75 to 1 in
Oral gavage <sup>1,2</sup>	0.01 ml/g	20-22 g feeding needle	5-10 ml/kg	16-20 g feeding needle

\*The first number is the volume given as an intravenous bolus over approximately 1 minute. The second volume is the volume that may be given as a slow infusion over 5-10 minutes.

**Table 1.** Recommended doses and needle sizes for various routes of compound administration in mice and rats.



# SOMMINISTRAZIONI ENTERALI - GAVAGE

**Somministrazione orale:** si usano sondini di plastica da *gavage* di dimensioni idonee agli animali utilizzati, con punta bottonuta atraumatica della lunghezza corretta per coprire la distanza dalla punta del naso al processo xifoideo. Il sondino è collegato ad una siringa. Contenendo l'animale immobilizzato in posizione verticale, il sondino viene fatto scivolare in esofago.

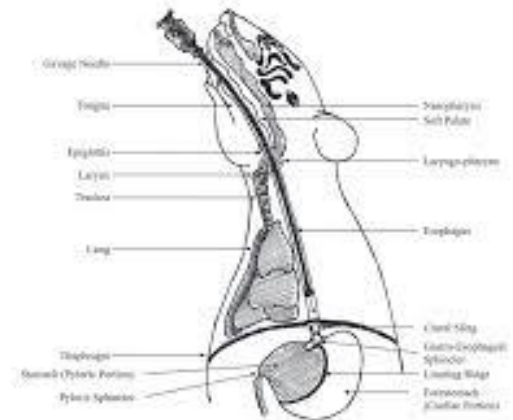
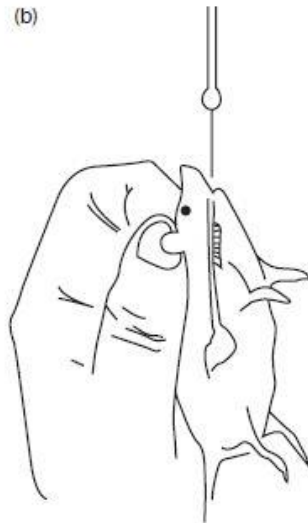


Figure 1. Anatomical diagram illustrating the anatomy of the rat respiratory and gastrointestinal systems. During gavage through the gavage nozzle, animals are being immobilized over the gastric esophageal sphincter. It is noted when there is a high volume contained in the stomach, it is often difficult to force the gavage tube into the esophagus. During expiration, the diaphragm contracts and the lungs expand, forcing air into the esophagus. This is the correct technique to use, as they are held in position and are not able to breathe through their mouth.

JAppl. Toxicol. 2011; 31:342–354



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

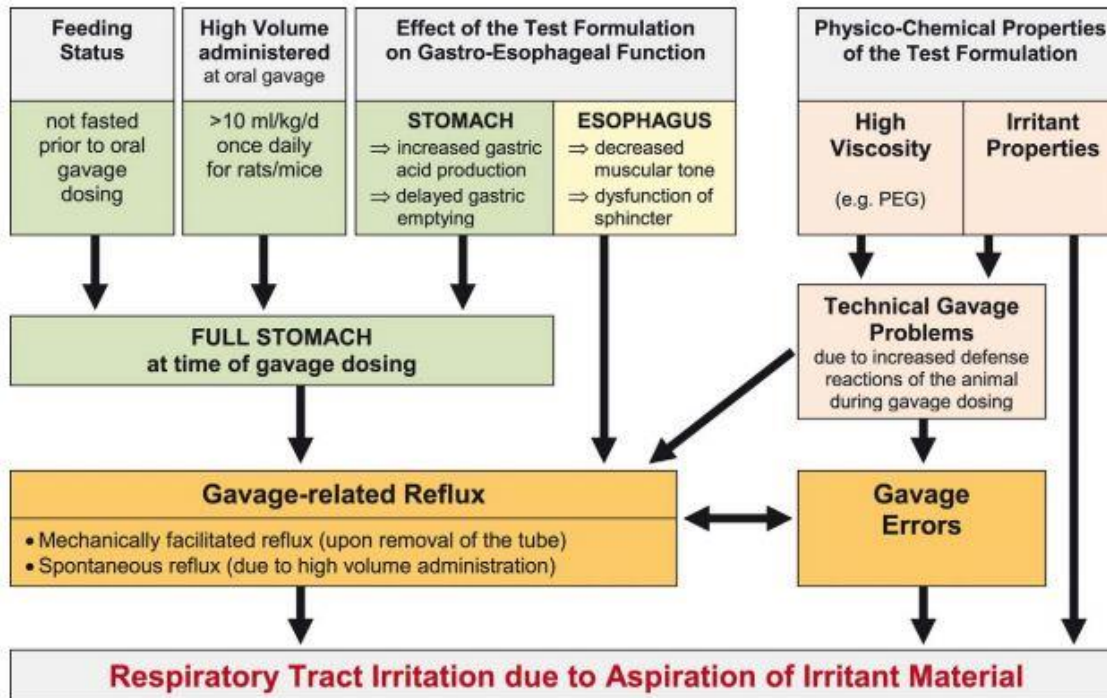
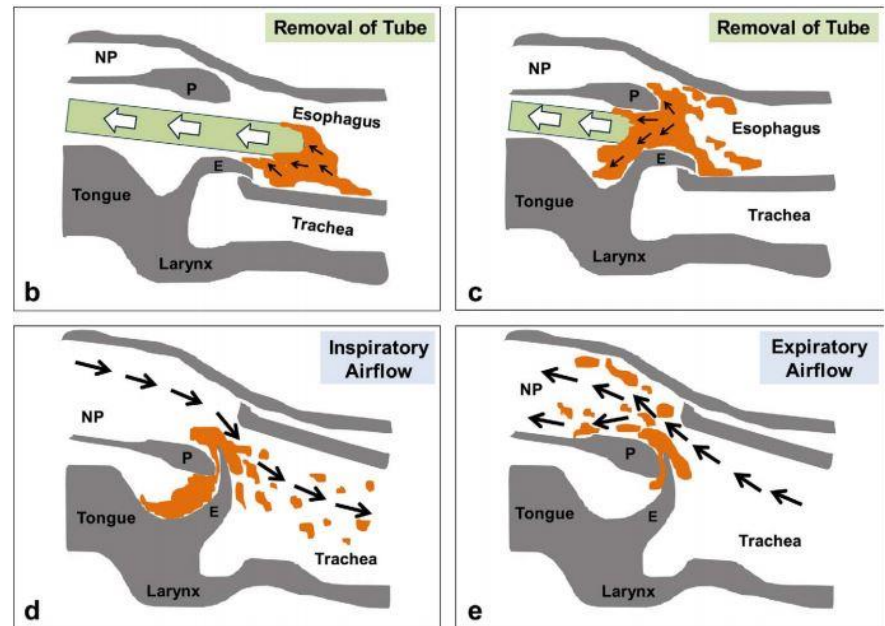


## Gavage-Related Reflux in Rats: Identification, Pathogenesis, and Toxicological Implications (Review)

SIEGRID DAMSCH<sup>1</sup>, GARY EICHENBAUM<sup>2</sup>, ALFRED TONELLI<sup>2</sup>, LIEVE LAMMENS<sup>1</sup>, KATHLEEN VAN DEN BULCK<sup>1</sup>, BIANCA FEYEN<sup>1</sup>, JOHN VANDENBERGHE<sup>1</sup>, ANTON MEGENS<sup>1</sup>, ELAINE KNIGHT<sup>2</sup>, AND MICHAEL KELLEY<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Johnson & Johnson Pharmaceutical Research and Development, a division of Janssen Pharmaceutica NV, Beerse, Belgium

<sup>2</sup>Johnson & Johnson Pharmaceutical Research and Development LLC, Raritan, New Jersey, USA



# SOMMINISTRAZIONI PARENTERALI

**Somministrazione sottocutanea:** l'animale viene manualmente immobilizzato e sollevata una plica cutanea, generalmente sul dorso.

Possono essere somministrati anche grossi volumi

Il rate di assorbimento è lento

- L'animale deve essere bloccato dalla collottola, approfittando per pollice e indice per creare la sacca in cui inserire l'ago.
- È importante pungere nella parte bassa della piega per limitare il rischio di intradermica.
- L'ago va inserito parallelamente al corpo e diretto posteriormente all'animale
- Aspirare prima per essere sicuri della posizione e iniettare
- La soluzione deve entrare senza resistenza e segnali di dolore da parte dell'animale



## **Somministrazione intradermica:**

-l'animale deve essere anestetizzato  
la parte deve essere depilata.

-Si inserisce l'ago, con il becco verso l'alto, parallelamente alla cute in modo molto superficiale

-Non aspirare

-Iniettare (volume non superiore a 0,05ml)



**A fine iniezione rimane visibile un piccolo rigonfiamento**

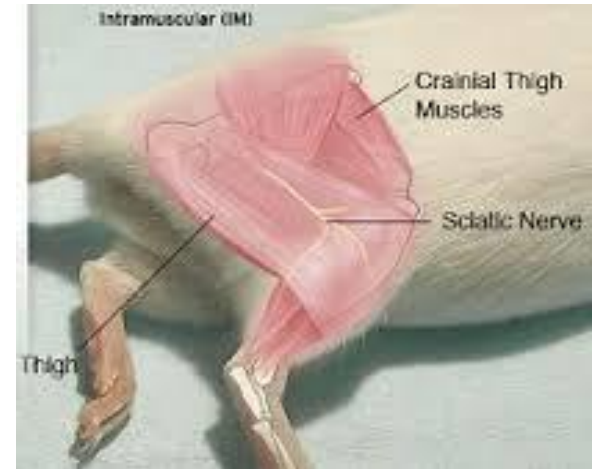


# SOMMINISTRAZIONE INTRAMUSCOLARE

**Somministrazione intramuscolare:** da evitare nel topo. Possono essere somministrati solo piccolissimi volumi

Si utilizza la zona della coscia facendo grande attenzione ad evitare il nervo sciatico

Per questo è meglio puntando l'ago caudalmente piuttosto che cranialmente, nei muscoli della coscia caudale



A



B

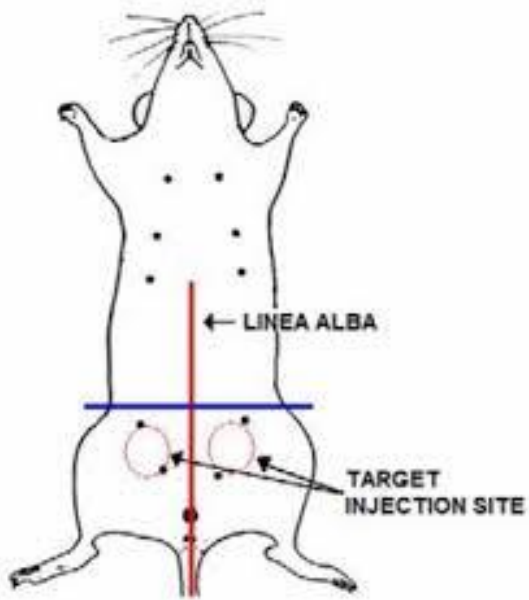


C





# SOMMINISTRAZIONE INTRAPERITONEALE



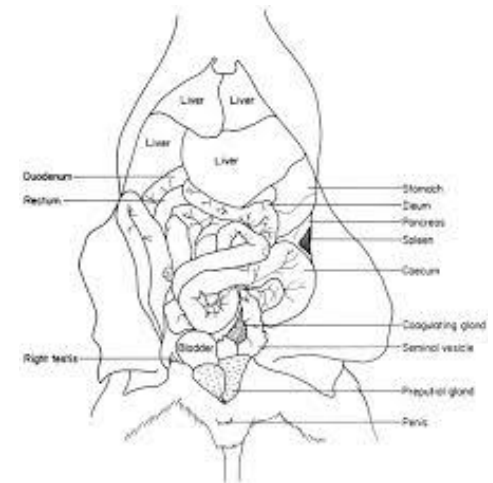
## Somministrazione intraperitoneale:

La via intraperitoneale è probabilmente la maggiormente utilizzata in quanto semplice da eseguire.

Il rate di assorbimento è circa da  $\frac{1}{2}$  a  $\frac{1}{4}$  la velocità di assorbimento di una endovenosa.

È possibile somministrare volumi abbastanza considerevoli I suoi limiti sono la possibilità di irritare i tessuti se si usano soluzioni a ph non fisiologico e idanni che si posso accidentalmente provocare se non si esegue correttamente la metodica

L'animale viene manualmente immobilizzato e posto in decubito dorsale in modo da identificare il quadrante inferiore destro dell'addome ed iniettare mediante una siringa La testa andrebbe leggermente più in basso rispetto al punto di inoculo L'ago tenuto abbastanza parallelo alla colonna vertebrale, in prossimità della linea alba





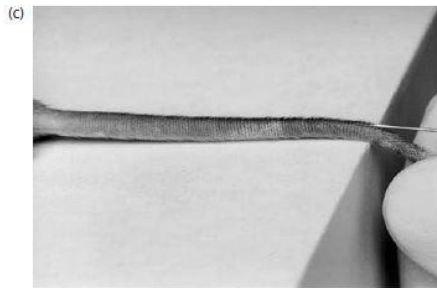
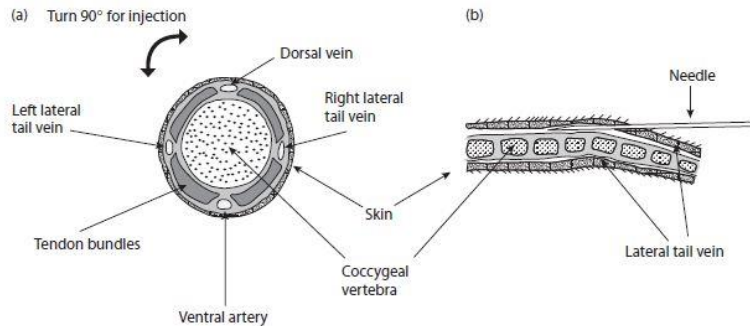
# SOMMINISTRAZIONE ENDOVENOSA DALLA CODA

**Somministrazione endovenosa.** La somministrazione (volume di somministrazione fino a 1 ml/kg) viene effettuata tramite la vena laterale della coda (topi e ratti).

La zona della puntura può essere preparata 30 minuti prima dell'iniezione con crema anestetica.

Per ottenere vasodilatazione si può utilizzare una lampada riscaldante, tappetini termici o immergere la coda in acqua calda (40-45°C)

Specialmente nel topo, è inevitabile danneggiare il vaso pertanto in caso di somministrazioni ripetute questo deve essere tenuto in considerazione



# PRELIEVO EMATICO → DECISION TREE



National Centre  
for the Replacement  
Refinement & Reduction  
of Animals in Research

A rat weighing 400 g would therefore have a total blood volume (TBV) of approximately 64 ml/kg x 0.4 kg = 25.6 ml.

A mouse weighing 25 g would therefore have a total blood volume (TBV) of approximately 58.5 ml/kg x 0.025 kg = 1.46 ml.

## 1. Do you require more than one blood sample from the same rat?

YES	NO
Maximum <10% TBV (= 2.56 ml) on any single occasion <b>AND</b> <15% TBV (= 3.84 ml) in 28 days	Maximum <10% TBV (= 2.56 ml)
For repeat bleeds at short intervals, maximum <1% TBV (= 0.25 ml) in 24 hours <b>AND</b> consider cannulation	OR terminal sample under general anaesthesia (volume unrestricted)

**Blood Volume Calculator for Rodents:** Blood volume can be related to body weight using the experimentally determined equation of Lee and Blafox;

$$BV = 0.06 \times BW + 0.77$$

In which blood volume = BV in mL and BW = body weight in grams. The equation was developed for the rat, but is reasonably accurate for mice. *Lee, H. B. and Blafox, M. D. Blood volume in the rat. J Nucl Med. 26:72-76 (1985).*

## 2. How much blood do you require?

Total of <3.0 ml		Total of >3.0 ml
General anaesthesia required	General anaesthesia not used	General anaesthesia required, non recovery
Saphenous vein Tail vein Sublingual vein Retro-orbital §	Sapenous vein Tail vein / Temporary cannula Jugluar vein Blood vessel cannulation *	Cardiac puncture Abdominal / thoracic blood vessel Retro-orbital Decapitation #

§ Only in exceptional circumstances

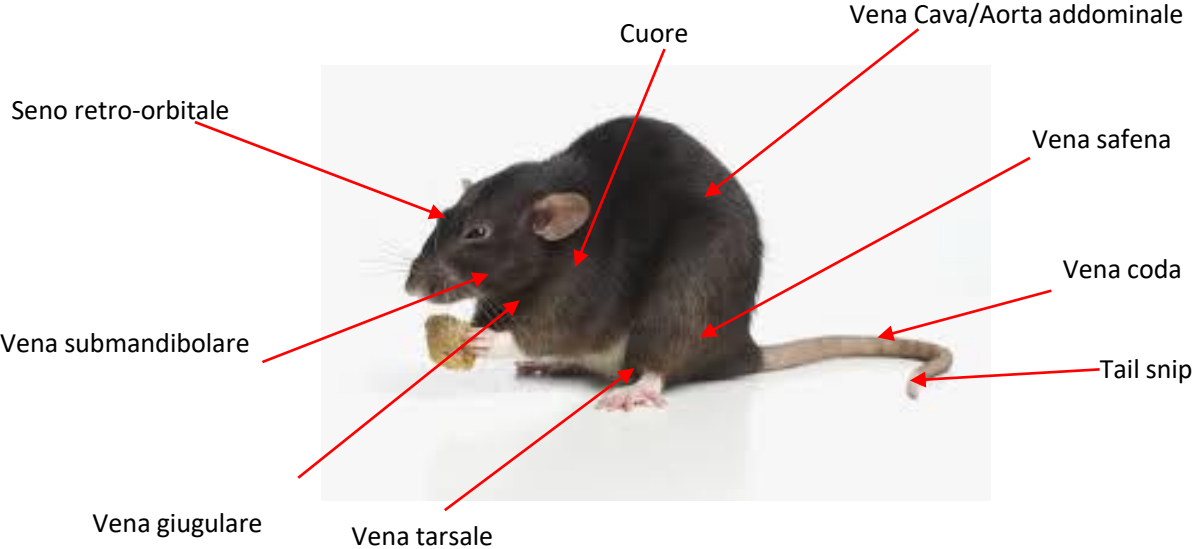
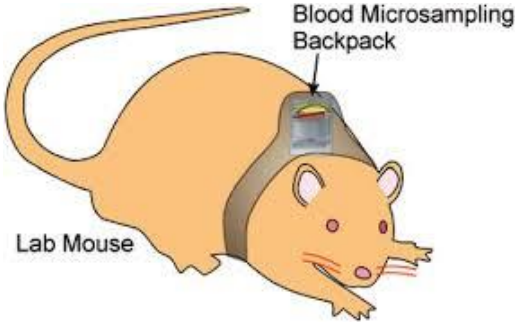
# Blood may be mixed with tissue fluid

\* Cannulation surgery performed under general anaesthesia



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# ALTRI ACCESSI VENOSI



# PRELIEVO DI FECI E URINE

Esistono diversi modi per raccogliere campioni di feci ed urine che devono essere scelti in base alle necessità:

- quantità del campione
- frequenza dei prelievi
- necessità di isolamento dell'animale
- «purezza» del campione

## Metodi non invasivi

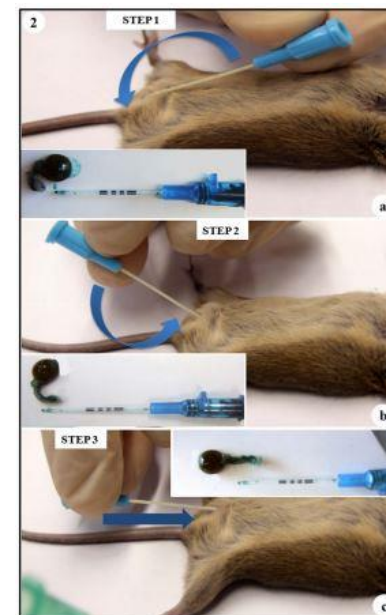
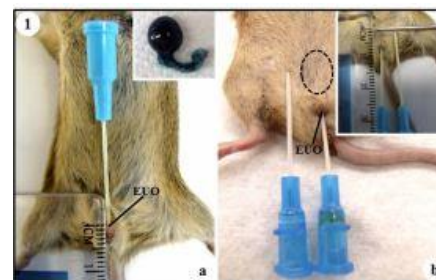


**A**



**B**

## Metodi invasivi



**C**





## Gabbie Metaboliche

- Permettono di sapere il consumo totale di cibo e acqua e l'escrezione totale di feci e urine nel tempo preso in considerazione
- È una procedura stressante: gli animali sono stabulati individualmente, su griglia senza possibilità di nascondersi.
- L'uso delle metaboliche è presente tra gli esempi di gravità delle procedure dell'allegato VII del D.Lgs 26/2014

LIEVE → confinamento di breve durata (<24h) in gabbie metaboliche

MODERATO → uso di gabbie metaboliche con restrizione del movimento per un lungo periodo (fino a 5 giorni)



Apprendere le tecniche di manipolazione, contenimento, somministrazione sostanze è certamente il primo passaggio obbligato per iniziare a lavorare con gli animali

La teoria aiuta nel conoscere le procedure corrette e le alternative possibili ma solo la pratica permette di eseguirle correttamente e valutarne limiti e potenzialità

- Eseguire le operazioni con lentezza non vuol dire avere maggiore cura
- Eseguire le operazioni molto rapidamente non vuol dire essere efficienti
- Parlare agli animali ha poco senso, serve precisione e decisione

La manipolazione e la eventuale immobilizzazione sono procedure semplici ma che possono essere una fonte enorme di stress per gli animali.

Considerate le conseguenze fisiologiche associate al distress è evidente che un buon lavoro inizia proprio da queste semplici e routinarie operazioni!





ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

**Luca Lorenzini**

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie

luca.lorenzini8@unibo.it

[www.unibo.it](http://www.unibo.it)