

**Introduzione ai principi di base del
comportamento, della cura e della
biologia.**

**La riproduzione sistemi idonei di
allevamento e arricchimento ambientale**



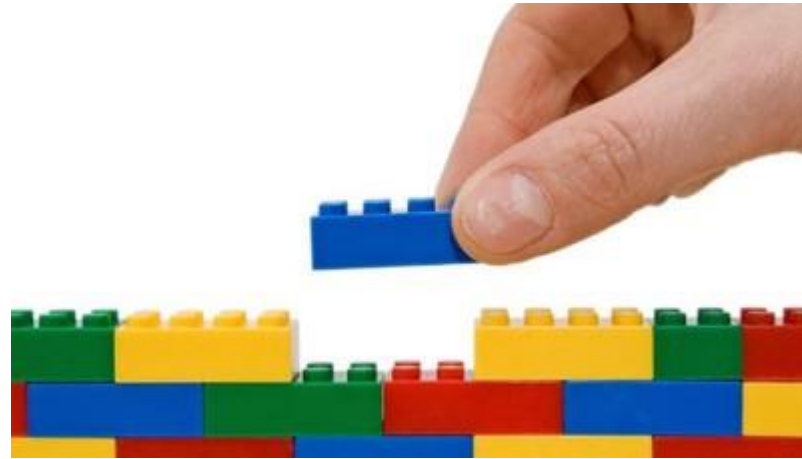
**Sessaggio degli animali e tecniche di
identificazione**

SANTA LUCIA

NEUROSCIENZE
E RIABILITAZIONE

Annarita Wirz

Buona gestione = Buona ricerca



Gestione

BUROCRAZIA

BENESSERE ANIMALE



RICERCA







Gestione

Una buona gestione degli animali da laboratorio prevede il coordinamento e la collaborazione di varie figure professionali:

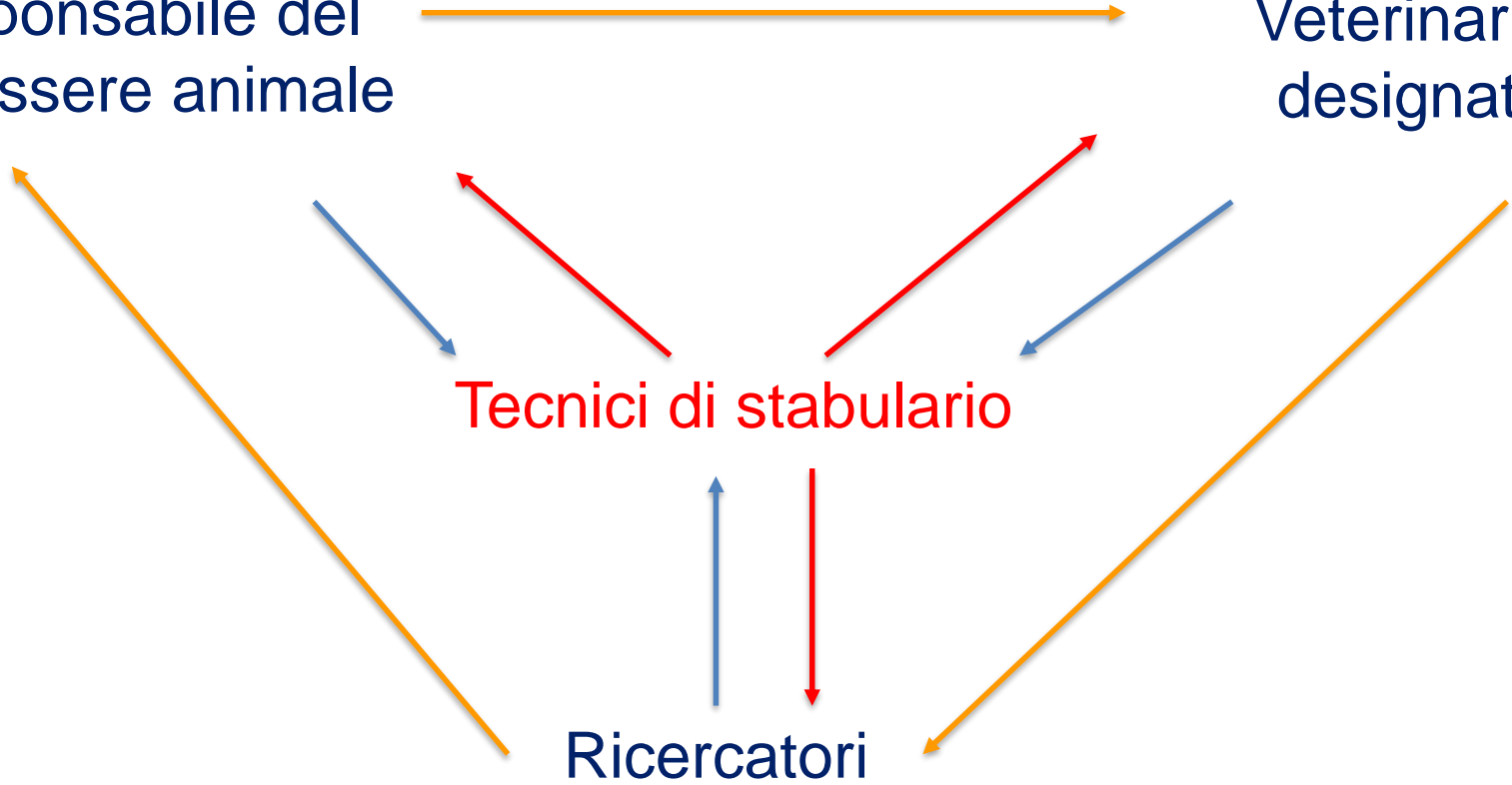
- il responsabile del benessere degli animali
- il veterinario designato
- i tecnici di stabulario
- i ricercatori che effettuano la sperimentazione



Adeguata formazione (art. 23, comma 2, D.Lgs 26/2014)

Responsabile del
benessere animale

Veterinario
designato



Consapevolezza



Cosa sapere?



La normativa vigente

In che tipologia di
stabulario stiamo
lavorando?



Cosa posso fare in questo
stabulario?

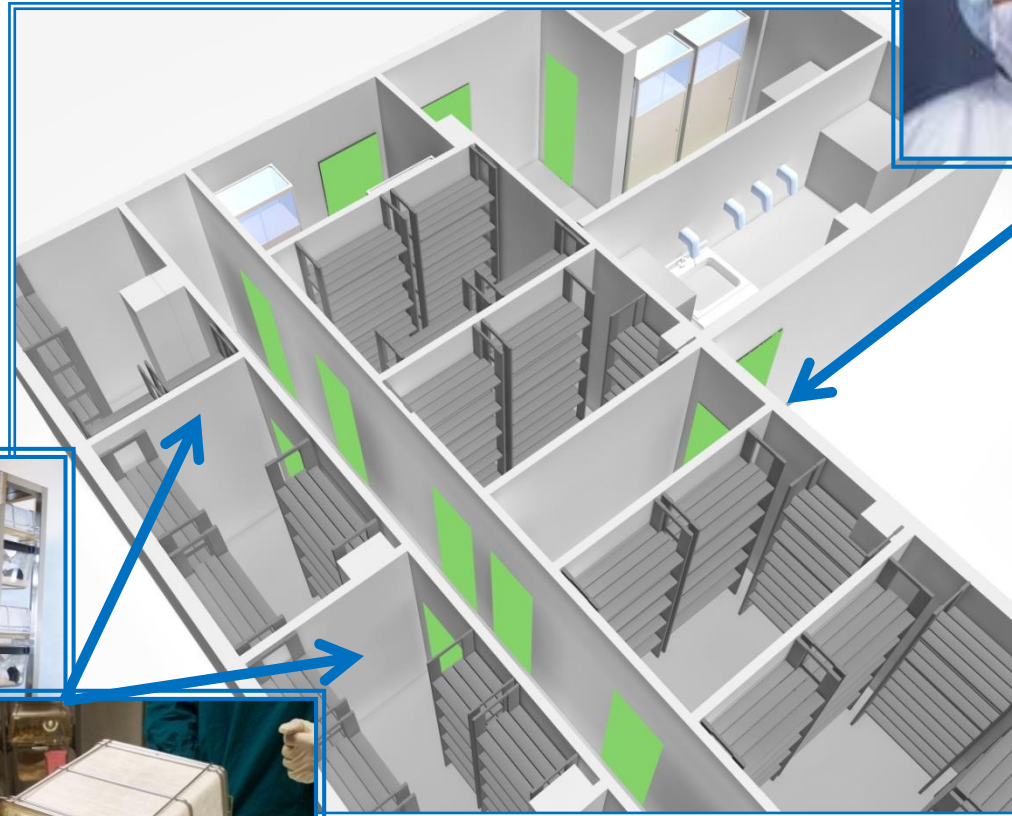


Conosco la specie e il ceppo
con cui sto lavorando?



Cosa sapere?

Stabulario: quali regole?



Dipende...



Stabulazione



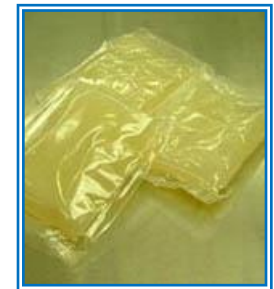
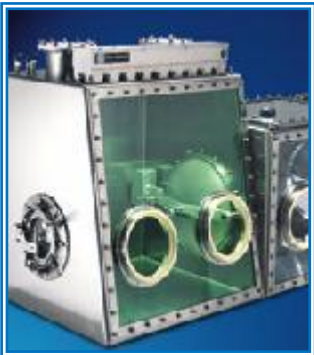
Animali Specific Pathogen Free



Stabulario barrierato



Animali Germ Free





Cosa sapere: stabulazione

D.Lgs 26/2014: Art. 22, comma 3 e Allegato III

Forniscono indicazioni a chi alleva o utilizza animali per esperimenti su come devono essere tenuti:

- ambiente che permetta il movimento
- possibilità di soddisfare i bisogni fisiologici e comportamentali
- controlli quotidiani delle colonie
- controlli periodici di un medico veterinario (art. 24)



Adeguate formazione (art. 23, comma 2, D.Lgs 26/2014)



Cosa sapere: stabulazione

Allegato III del D.Lgs 26/2014



■ Ambiente e relativo controllo:

- ✓ Ventilazione e temperatura (...la T è misurata e registrata ogni giorno)
- ✓ Illuminazione
- ✓ Rumore
- ✓ Impianti di allarme

■ Cura degli animali:

✓ Salute:

Gli stabilimenti sono dotati di una strategia che garantisca il mantenimento di uno stato di salute degli animali che salvaguardi il benessere degli animali e risponda ai requisiti scientifici. Tale strategia comprende un controllo sanitario periodico ...





Allegato III del D.Lgs 26/2014

■ ... Cura degli animali:



- **Alloggiamento e arricchimento**

- **Alimentazione:**

✓ Forma, contenuto e presentazione ...

✓ Alimenti gustosi e non contaminati

✓ Imballo, trasporto e stoccaggio

✓ Possibilità di accesso agli alimenti da parte di tutti gli animali (Refinement)

- **Abbeveraggio**

✓ Acqua potabile non infetta

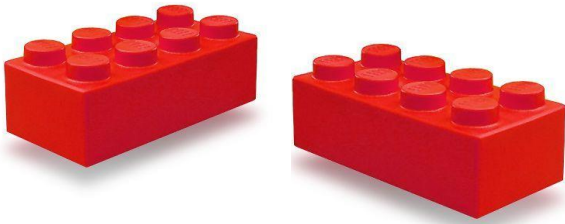
✓ Manutenzione degli abbeveratoi automatici

✓ ...

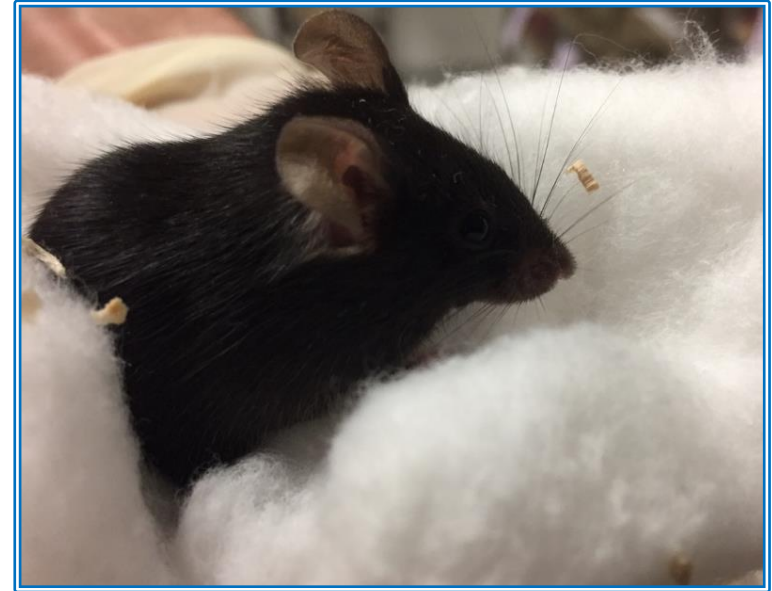
- **Zone per il riposo**



Cosa sapere?



Conosco **la specie** con cui sto lavorando?



Quali sono le principali caratteristiche e comportamenti specie-specifici?



Cosa posso fare per salvaguardare il benessere degli animali con cui lavoro?



Benessere animale

Benessere = lo stato fisiologico e psicologico di un individuo in relazione al suo ambiente

Quando un animale è in grado di adattarsi facilmente ai cambiamenti del suo ambiente, si dice che è in equilibrio e, pertanto, si trova in uno stato di benessere

Ambiente



Individuo



BENESSERE ANIMALE

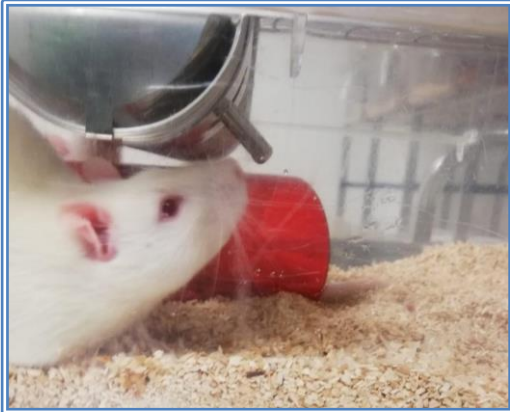
Benessere animale

Cosa tenere ben presente?



Le 5 libertà (R. Brambell, 1965) ...

dalla fame e dalla sete



Libero accesso ad
acqua e cibo



Ambiente adeguato
con rifugi

dalla sofferenza



Benessere animale

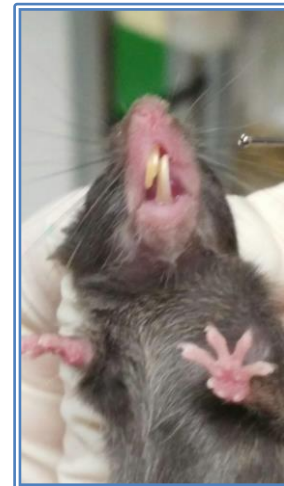


Libertà ...

dal dolore e dalle malattie

di poter esprimere un
comportamento normale

Prevenzione e cura



Ambiente sufficientemente
grande,
corretta stabulazione,
arricchimento sociale

dalla paura e dall'angoscia



Condizioni e
trattamenti che
evitino la sofferenza e
lo stress



Refinement



Allegato III del D.Lgs 26/2014

(Sez. B: sezione riguardante le singole specie) 1° gennaio 2017

TOPI	Peso gr	Dimensione minima cm ²	Spazio al suolo per animale	Altezza minima
In riserva e procedure	Fino a 20	330	60	12
	20 - 25	330	70	12
	25 - 30	330	80	12
	Oltre 30	330	100	12
Riproduzione		330 Per coppia monogama o un trio. Per ogni ulteriore femmina e figliata aggiungere 180 cm ²		12



RATTI

RATTI	Peso gr	Dimensione minima cm ²	Spazio al suolo per animale	Altezza minima
In riserva e procedure	Fino a 200	800	200	18
	200 - 300	800	250	18
	300 - 400	800	350	18
	400 - 600	800	450	18
	Oltre 600	1500	600	18
Riproduzione		800 Madre e figliata. Per ciascun animale adulto aggiunto in via permanente aggiungere 400 cm ²		18

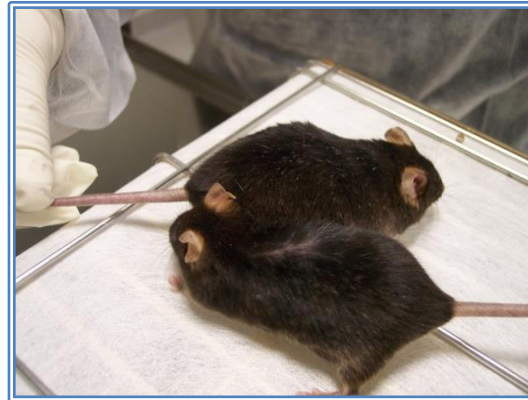




Benessere animale

A cosa prestare attenzione ...

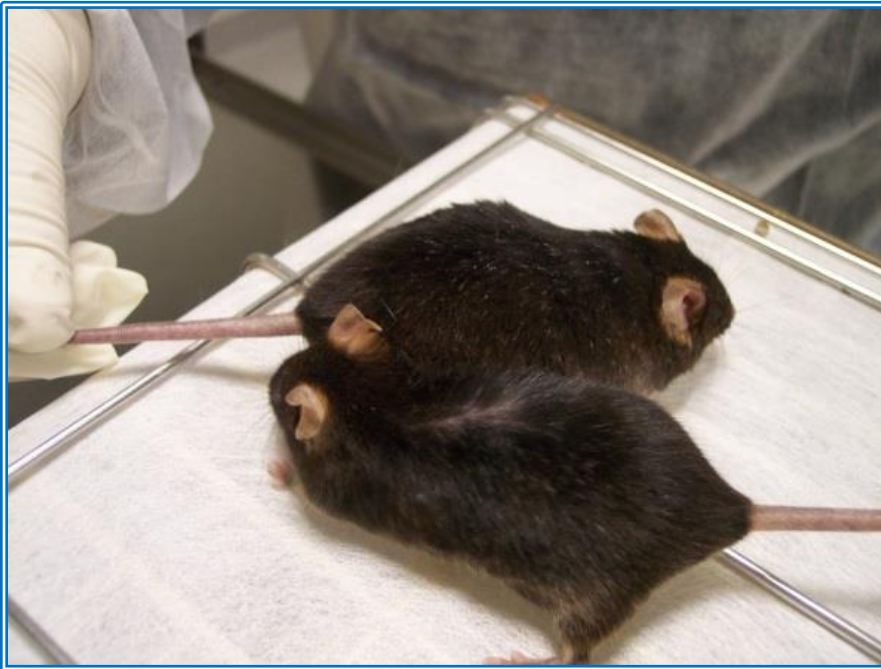
- Adeguata crescita ponderale
- Durata della vita
- Adeguati comportamenti specie-specifici
- Capacità riproduttiva
- Corrette cure parentali
- Buone condizioni fisiche →
- Assenza di malattie
- Corretta postura
- Sistema immunitario efficiente





Benessere animale

Controllo clinico



- Lucentezza del pelo
- Presenza di zone di alopecia
- Presenza di ferite
- Stato delle vibrisse
- Presenza di secrezioni da orecchi, occhi, naso,
- Crescita dei denti
- Controllo zampe anteriori
- Controllo zampe posteriori
- Controllo zona genitale



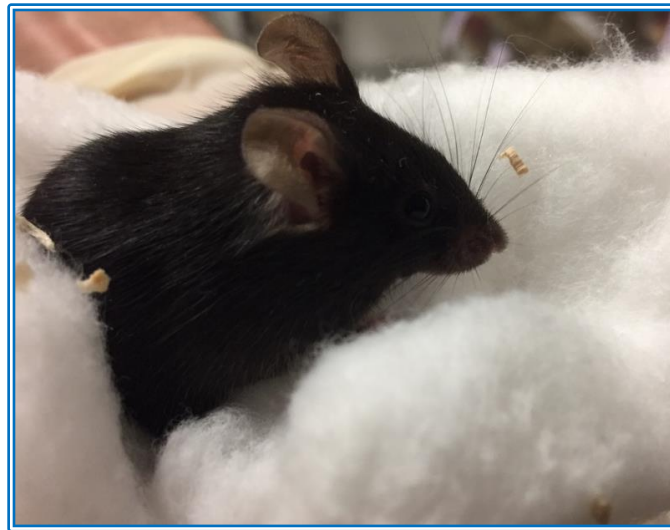
Benessere animale



E' importante osservare gli animali, il loro comportamento al fine di evidenziare tempestivamente eventuali segni di sofferenza e di stress.

Perché questo sia possibile occorre conoscere il comportamento degli animali.

Conosco **la specie** con cui sto lavorando?





Benessere animale

I comportamenti che sono essenziali per la sopravvivenza, come l'alimentazione, la costruzione del nido, il comportamento sociale, quello offensivo e difensivo, sessuale e materno, sono determinati geneticamente anche se possono essere adattati ai cambiamenti dell'ambiente.

Questo permette anche di poter organizzare e gestire un adeguato programma di arricchimento ambientale





Partiamo dal comportamento in natura

Cosa dicono queste
immagini?





E queste immagini?

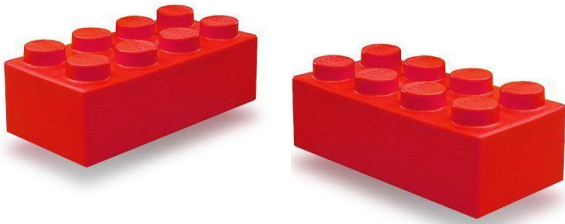




E ancora ...



Arricchimento ambientale

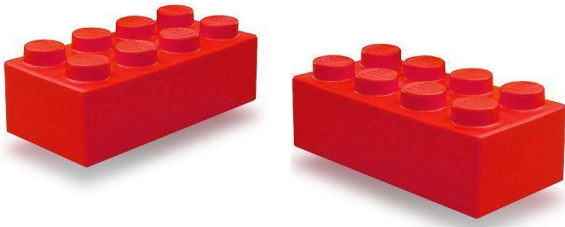


Un programma di arricchimento ambientale non deve «copiare» l'ambiente naturale, ma deve proporre un ambiente adatto ad espletare i comportamenti specie-specifici e permettere agli animali di soddisfare i propri bisogni

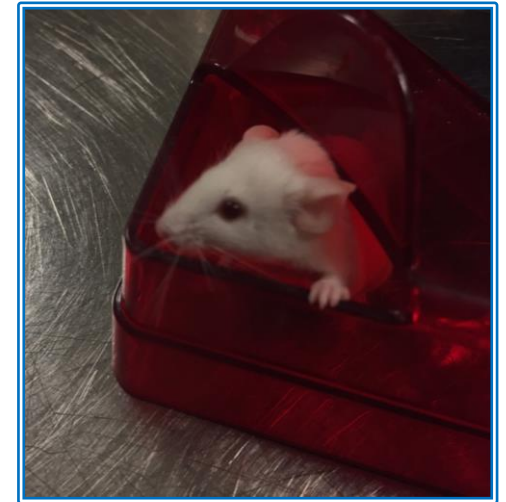
Per i topi e i ratti da laboratorio è importante avere nella gabbia una casetta nido o un tunnel e del materiale per la costruzione del nido



Arricchimento ambientale



La casetta nido sarà diversa a seconda della specie



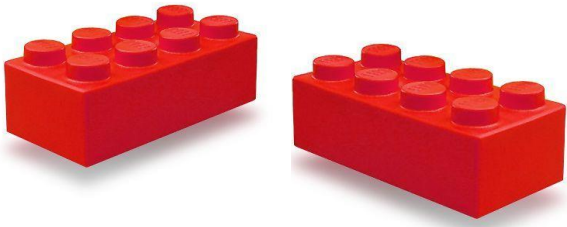
Arricchimento ambientale

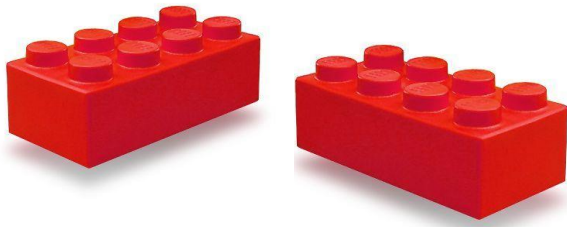


Anche la lettiera può diventare un arricchimento ambientale



Arricchimento ambientale





Arricchimento ambientale

Programma di arricchimento ambientale → **comunicazione**

- Responsabile del Benessere degli animali
- Veterinario
- Ricercatori
- Tecnici di stabulario

→ **Formazione**

Gestione
(costi, tempo)



**Benessere
animale**



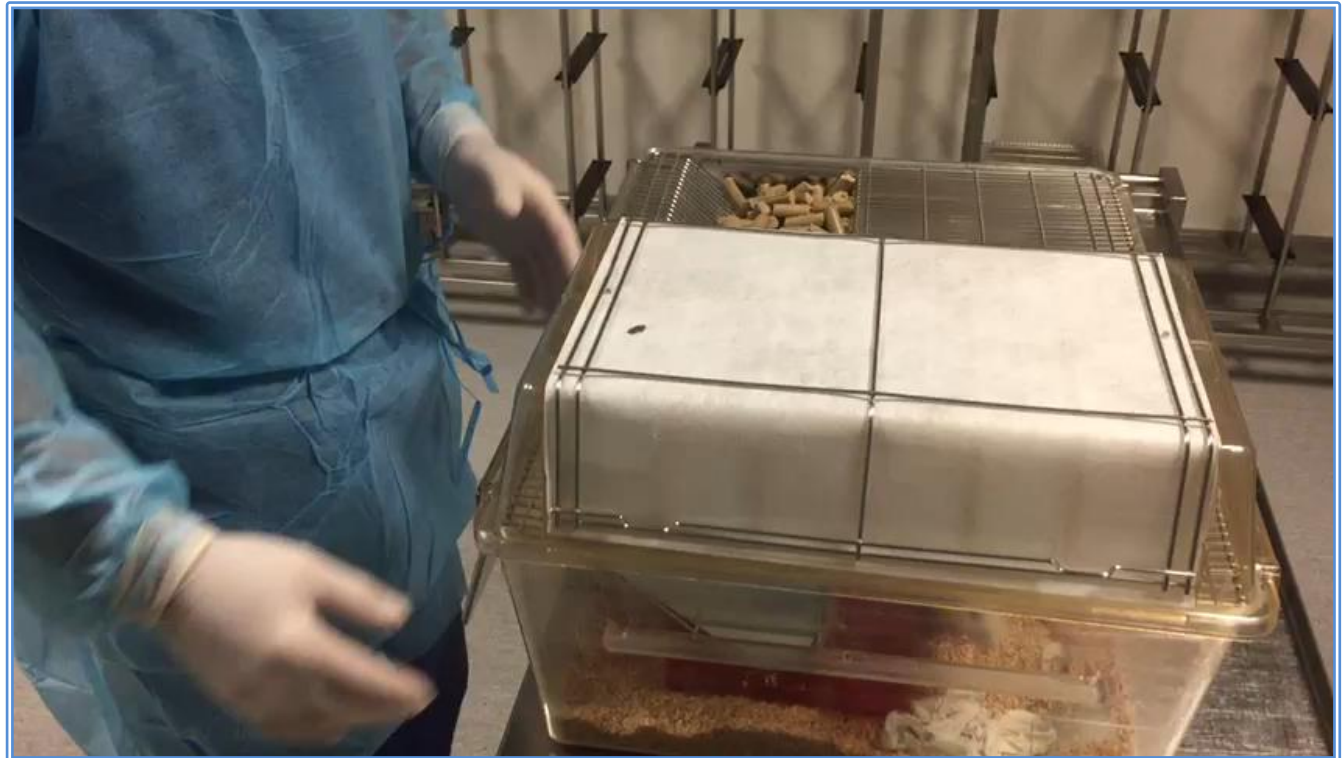
RICERCA

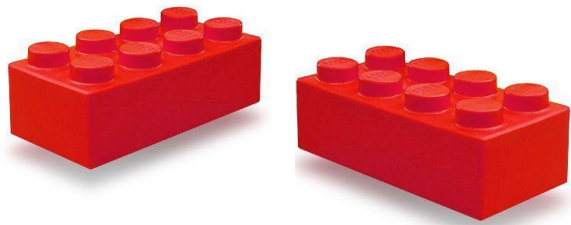


Arricchimento ambientale

Gestione

(costi, tempo)





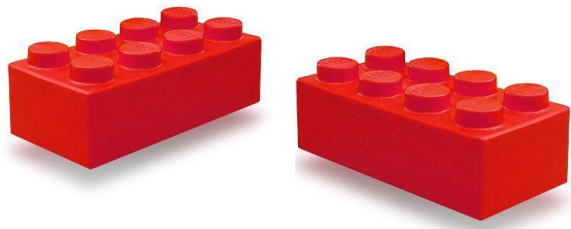
Arricchimento ambientale

Gestione
(costi, tempo)



Tanta scelta

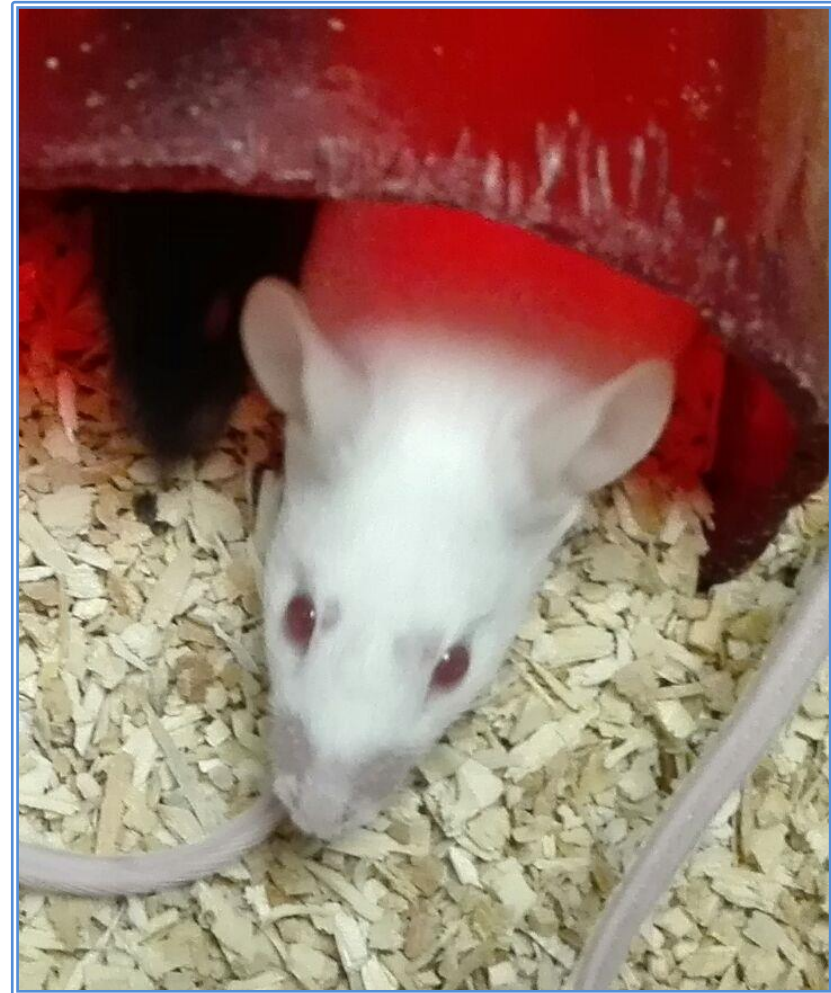


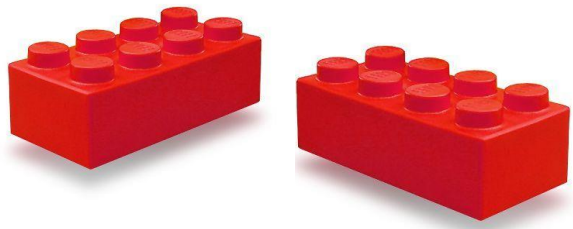


Arricchimento ambientale

Benessere animale

Può essere anche un luogo di rifugio e di separazione temporanea dagli altri individui del gruppo sociale

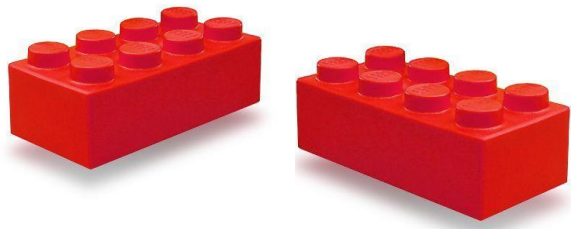




Arricchimento ambientale

**Benessere
animale**



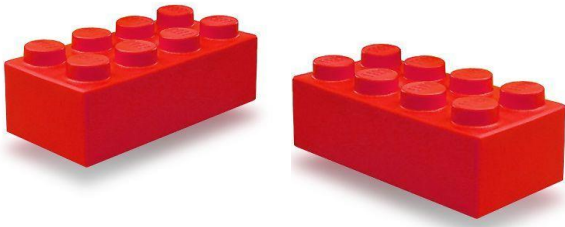


Arricchimento ambientale

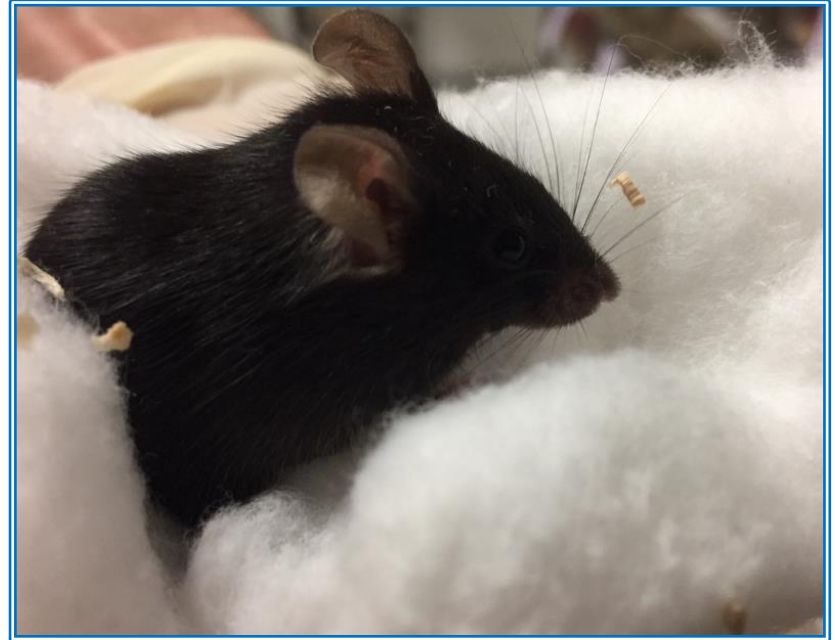
**Benessere
animale**



Cosa sapere ancora?



Conosco **il ceppo** con cui sto lavorando?





Conosco la specie con cui sto lavorando?

Tutto questo inizia da quando si apre la gabbia....



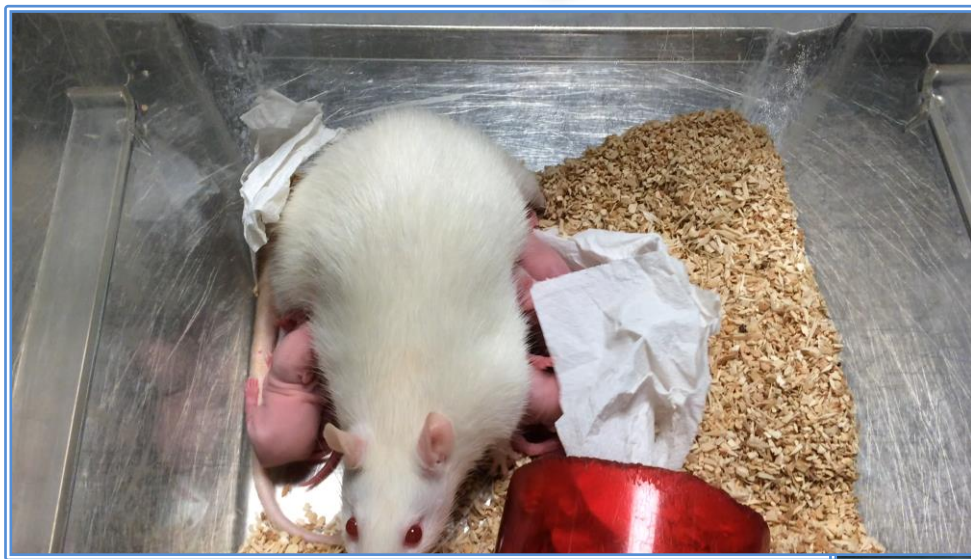
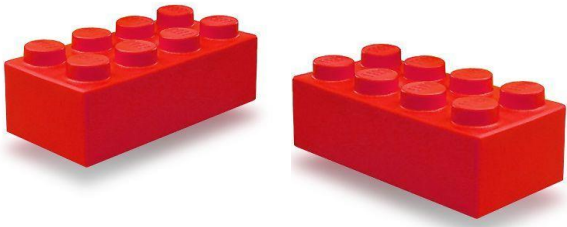
... e dall'approccio che si ha con l'animale
(tecnici di stabulario, ricercatori, veterinario, responsabile benessere)



Ratti: entrare in contatto con gli animali e farsi conoscere



Arricchimento ambientale



RATTO: BD-IV

Portano una mutazione puntiforme nella porzione non tradotta dell'mRNA codificante per alfa-sinucleina.

Tale mutazione è presente nei soli animali affetti da un disordine neurologico che si manifesta durante il 1° mese di vita (Stoica et al, 2012).

Tale disordine è caratterizzato da:

- tremore
- rigidità e bradicinesia
- instabilità posturale

Gli animali affetti da questo disordine neurologico hanno il capo grigio, invece di nero





Conoscenza della specie e del ceppo

Possibile alopecia durante le fasi dell'allattamento



Dieta più arricchita



Entrambi i sessi sono piuttosto "agitati"



Personale preparato e formato





Benessere animale

Burocrazia ...

Score sheets

National Competent Authorities for the implementation of Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes

- CORRIGENDUM of 24 January 2013 -

Working document on genetically altered animals

Se si usano animali transgenici



Linee guida



Benessere animale

Burocrazia ...

20. Dichiarazioni riferite all'Art. 13, comma 2

a. Sostituzione ...

b. Riduzione ...

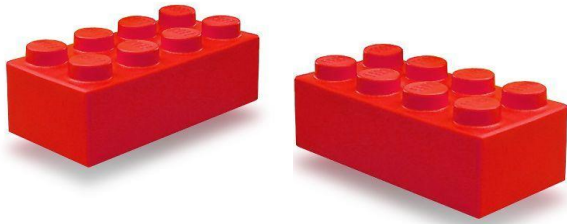
c. Affinamento ...

d. Rapporto danno beneficio

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



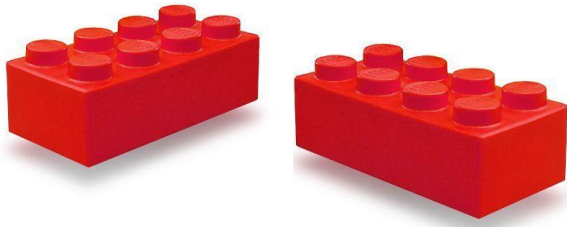
Arricchimento ambientale



E' importante nel periodo della gravidanza e dell'allevamento dei piccoli, per permettere di costruire il nido



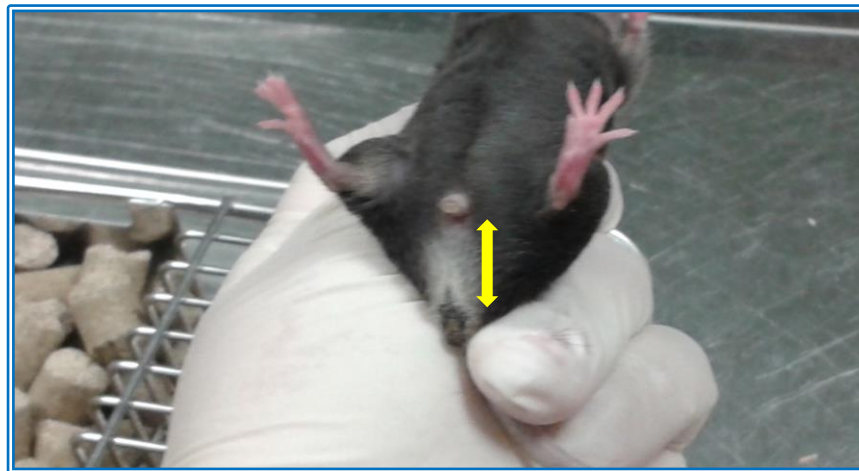




Riproduzione

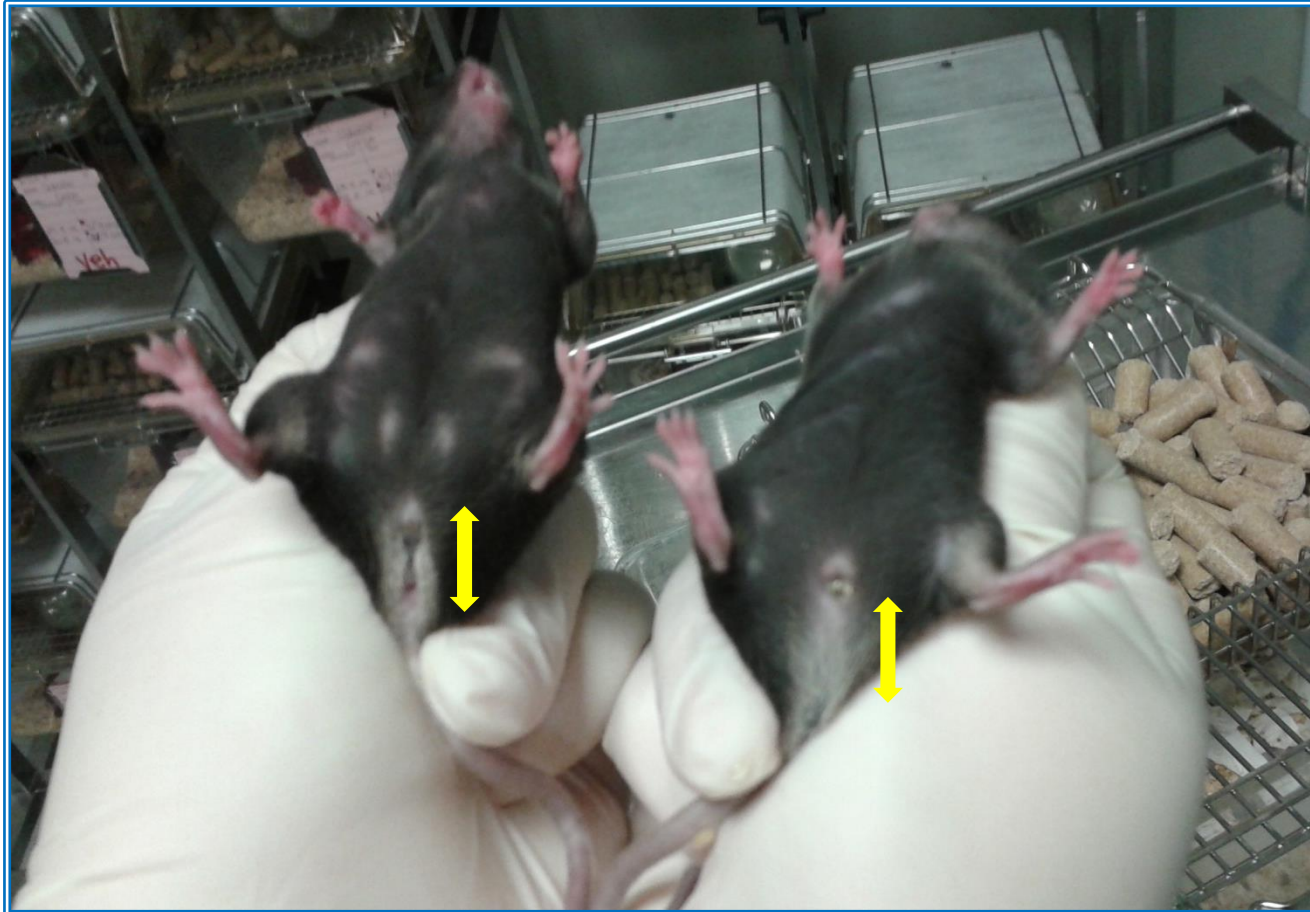
Riconoscimento del sesso

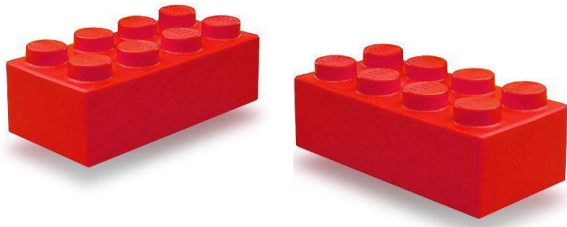
Ci si basa sulla distanza tra l'apertura anale e l'orifizio genitale



E' maggiore nel maschio, rispetto alla femmina

Riconoscimento del sesso nel topo





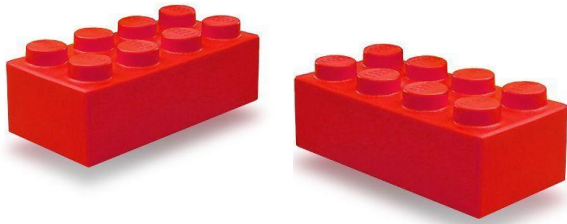
Riproduzione

Nel topo, generalmente, i comportamenti di corteggiamento e di accoppiamento durante il ciclo notturno.

Durante le fasi di corteggiamento il maschio si avvicina alla femmina in estro, prima l'annusa, poi inizia a seguirla.

Al corteggiamento segue l'accoppiamento.





Riproduzione

E' avvenuto l'accoppiamento?

Nelle 24 ore successive all'accoppiamento, nella vagina della femmina è possibile vedere il cosiddetto «*plug*» o «tappo di coagulazione»

Questo «tappo» serve per 3 scopi:

- fornisce una barriera fisica ad un nuovo accoppiamento da parte di un altro maschio
- fornisce una stimolazione fisica necessaria per la formazione del corpo luteo
- aiuta a mantenere gli spermatozoi all'interno dell'utero



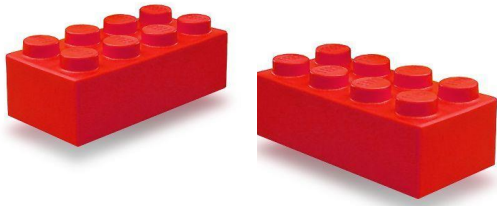
Riconoscimento del sesso nel ratto



Cosa notate che non va?



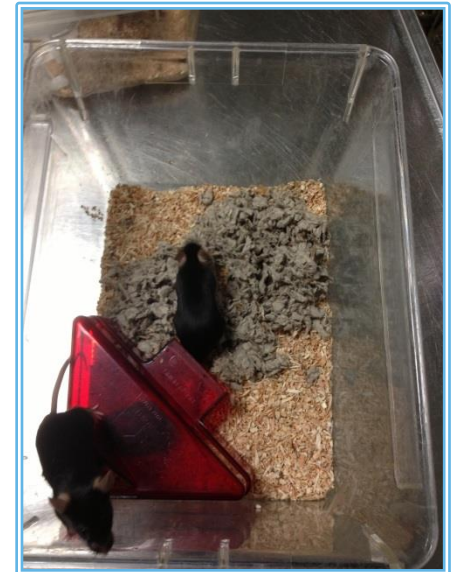
Riproduzione



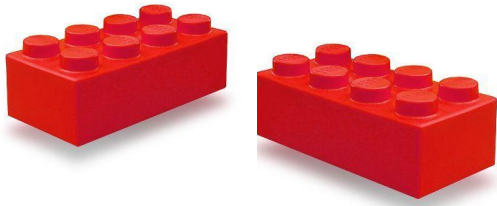
Se le femmine vengono tenute in una gabbia tutte insieme senza maschi tendono a non andare in calore, ma l'introduzione di un maschio può portare alla sincronizzazione dei loro cicli estrali



Effetto Whitten



Riproduzione

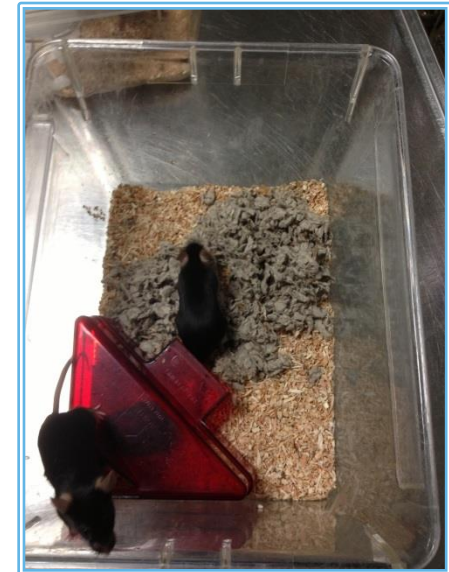


Quale strategia riproduttiva adottare?

- 1 maschio con 1 femmina (coppia monogamica)
- 1 maschio con 2 femmine
- 1 maschio con 3-6 femmine (allevamento poligamico: *harem*)



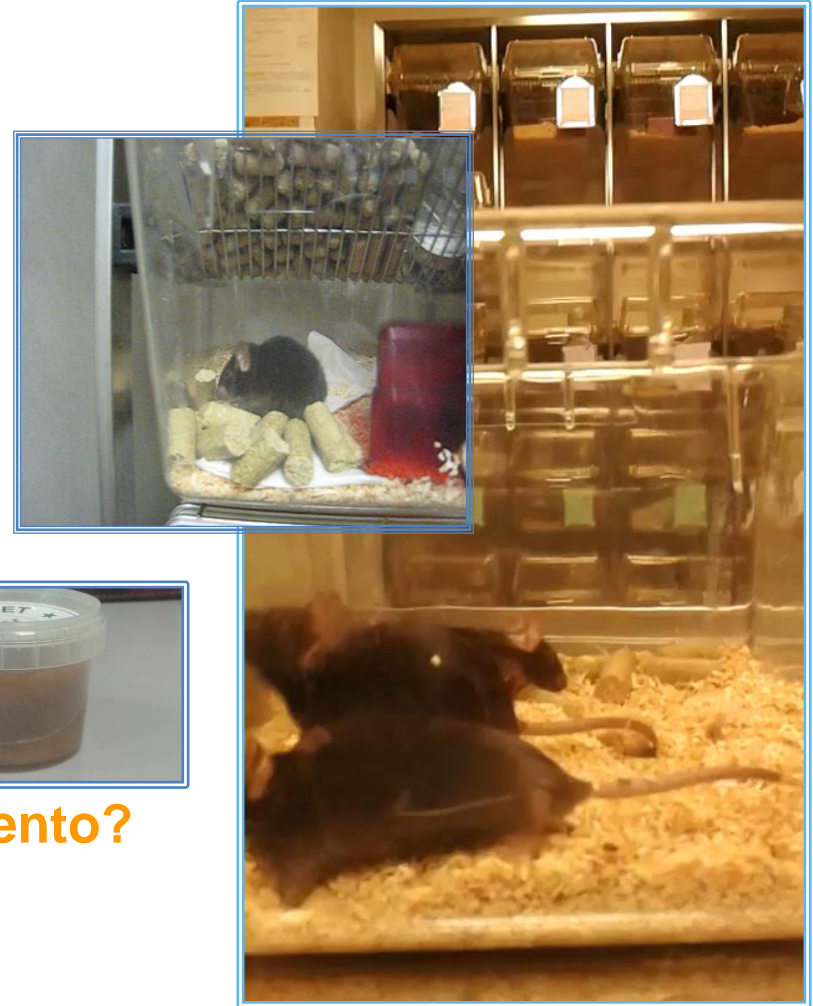
Dipende...



TOPO: B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J → G93A-SOD1

Modello murino per lo studio della SLA

- Mutazione spontanea
- Per mantenere la colonia occorre tenere presente che le femmine omozigoti sono poco fertili e, pertanto si preferisce utilizzare femmine C57BL/6
- Vita media ridotta:
50% sopravvive a 128.9+/-9.1gg vs i 157.1+/-9.3 dei C57BL/6
- Generalmente il ceppo C57BL/6 è anche quello che si utilizza come controllo



Strategie di accoppiamento?

Arricchimento?

Altro per salvaguardare il benessere?

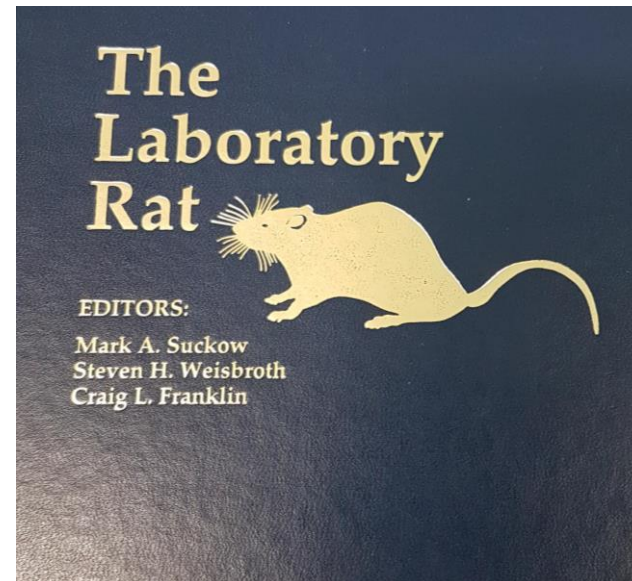
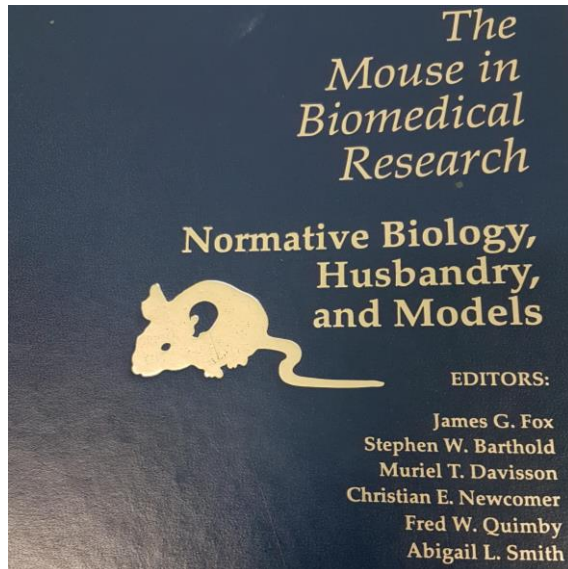


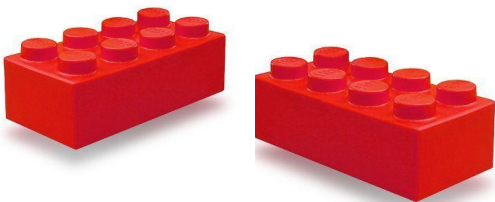


Riproduzione

TABLE 3-3
BASIC REPRODUCTIVE PARAMETERS OF COMMONLY USED LABORATORY MICE

	Age Mated (weeks)	Age First Litter Born (weeks)	Average Litter Size Born	Ratio of Mice Weaned to Born	Sex Ratio (% female)	Litters per Female
BALB/c ByJ	6.38	10.91	4.71	0.86	55.59	4.37
CBA/J	7.03	10.96	4.02	0.84	49.34	4.9
C3H/HeJ	7.15	10.45	5.64	0.89	49.58	4.58
DBA/2J	8.03	11.63	5.31	0.79	47.42	4.78
C57BL/6J	7.31	11.29	5.84	0.80	52	4.9
Ctrl:CD1(SW)	7	10.21	11.24	0.996	50	NA





Riproduzione

**Prestare
attenzione a ...**



**Condizioni
ambientali**



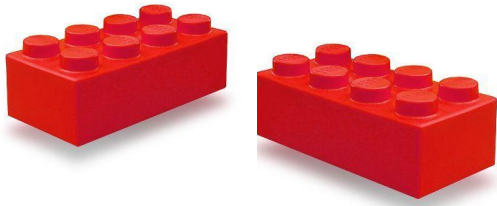
Alimentazione



Cambio gabbia



Riproduzione



Se variano i requisiti ambientali?

Devono essere evitate ampie fluttuazioni della T e dell'umidità



Oltre ad un aumento della suscettibilità alle infezioni veicolate dall'aria, possono esservi influenze sulla riproduzione di alcuni ceppi

Il microclima all'interno della gabbia dipende:

- dal tipo di gabbia
- dalla posizione della gabbia nel rack e nel locale
- dal sistema di ventilazione
- dal n° di animali
- dall'uso o meno di un coperchio con filtro
- dalla frequenza della pulizia delle gabbie





Riproduzione

Alimentazione

Nel nostro stabulario ...

Utilizzo di 3 mangimi diversi:

	Per animali in riproduzione	Per animali svezzati	Altro
Umidità	12 %	12 %	12 %
Proteine	22 %	18.50 %	18.50 %
Grassi	3.50 %	3 %	5.50 %
Fibra grezza	4.50 %	6 %	4.50 %
Ceneri	7.50 %	7 %	6 %





Riproduzione

Alimentazione

Altre differenze:

	Per animali in riproduzione	Per animali svezzati	Altro
Vitamina A	16000 U.I.	14400 U.I.	15000 U.I.
Vitamina K₃	3.1 mg	2.8 mg	50 mg
Vitamina B₁₂	0.030 mg	0.027 mg	0.08 mg
Acido Folico	2.1 mg	1.92 mg	3.0 mg
Ferro	200 mg	180 mg	50 mg





Riproduzione

Alimentazione

Abbiamo provato ...



	Nuovo	↑
Proteine	19 %	↑
Grassi	9 %	↑
Fibra grezza	5 %	





Riproduzione

Semi di girasole



contengono:

- grassi essenziali (importanti x lo sviluppo del sistema nervoso)
- molte proteine
- elevata concentrazione di minerali (in particolare FE e Mg)
- oligoelementi, quali rame e cobalto
- vitamine, quali quelle del gruppo B e la vitamina E



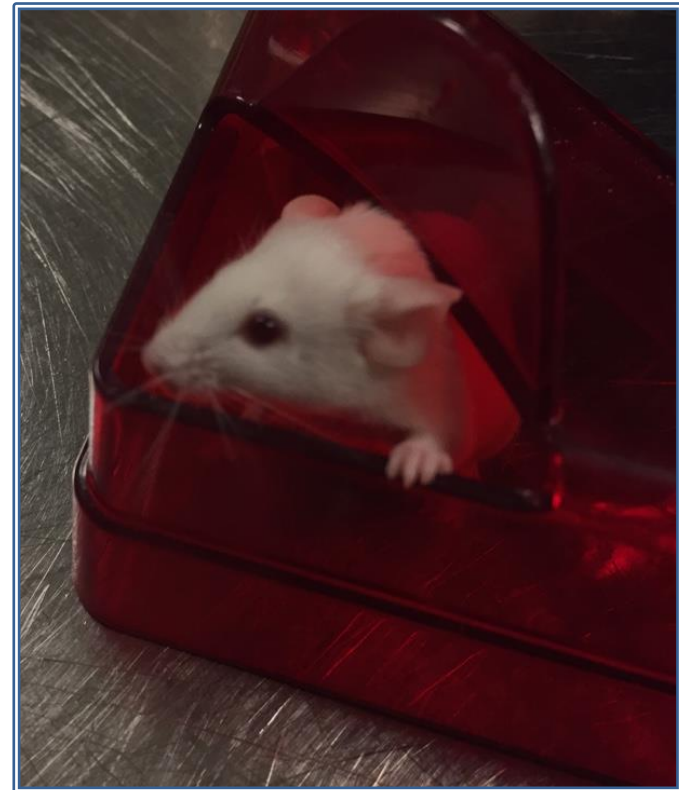


La Jackson Lab suggerisce ...

«Love Mash»

Mangime con:

- fiocchi d'avena
- germe di grano
- lievito di birra
- olio di fegato di merluzzo



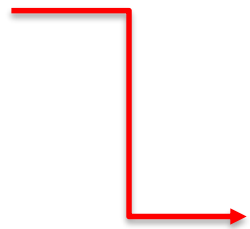


Aspetti critici ... sempre e comunque

Cibo ed acqua possono veicolare patogeni



- Non scambiare le bottiglie di abbeverazione tra gabbie diverse
- Non riutilizzare il cibo rimanente quando una gabbia viene eliminata



al più solo per animali “sentinella”



Riproduzione dopo un trasporto?



Raccomandazioni 526/2007 (Parte generale, Punto 4.4)

■ ...

- c. **dopo un periodo di acclimatazione, promuovere una buona prassi scientifica.**

A seconda dei casi, questi periodi possono variare e sono fissati o da norme nazionali dello Stato membro interessato o dalla persona competente, in genere il veterinario, nominata dallo stabilimento



Cosa sapere: Stabulazione/Benessere degli animali

Quarantena

Per quarantena s'intende il periodo nel quale animali inseriti per la prima volta o reinseriti sono mantenuti separati dagli animali presenti nello stabilimento per determinarne le condizioni di salute e impedire l'introduzione di malattie. È consigliabile applicare un periodo di quarantena quando non si conosce lo stato di salute di un animale.

Acclimatazione

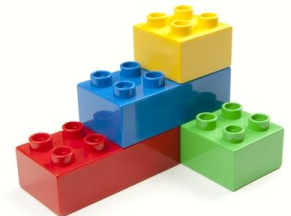
Un periodo di acclimatazione si rivela necessario per consentire agli animali di recuperare dallo stress del trasporto, di abituarsi al nuovo ambiente e per mettere in atto le necessarie pratiche di tutela e manutenzione. Il periodo di acclimatazione è necessario anche per gli animali che sembrano godere di buona salute, prima che vengano impiegati nelle procedure del caso. La durata dell'acclimatazione dipende da vari fattori quali lo stress a cui è stato sottoposto l'animale che, a sua volta, varia in funzione di diversi fattori quali la durata del trasporto, l'età dell'animale e il cambiamento dell'ambiente sociale. Si tenga presente che dopo un trasporto internazionale può essere necessario un periodo di acclimatazione più lungo a causa delle perturbazioni al ritmo diurno dell'animale.

Isolamento

Un periodo di isolamento serve a ridurre il rischio di infezione ad altri animali o persone. Gli animali che possono rappresentare un rischio di questo tipo dovrebbero essere sistemati in una struttura separata.



Formazione/ Conoscenza dell'animale



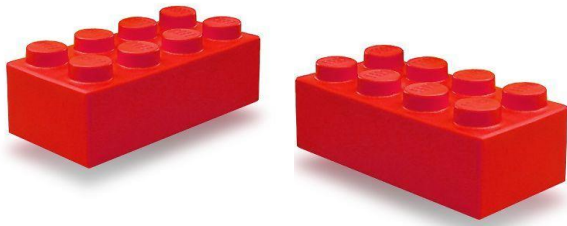
E quando abbiamo nidiate





Cambio gabbia quando ci sono le nidiate...





Cambio gabbia quando ci sono le nidiate...



Tunnel



Cup



Riproduzione: può essere necessario riconoscere il singolo animale....



1 giorno



2-3 giorni



5-7 giorni







Tecniche di identificazione

- Metodi non invasivi e temporanei
- Metodi invasivi e temporanei
- Metodi invasivi e permanenti





Tecniche di identificazione

Metodi non invasivi e temporanei

- Taglio del pelo
- Marcatura del pelo o della pelle con colore





Tecniche di identificazione

Metodi non invasivi e temporanei

■ Taglio del pelo

- Da utilizzare su animali svezzati o adulti (non prima delle 2 settimane di vita)
- Utilizzare forbici a punta smussa o rasoi elettrici



Criticità

Durata limitata nel tempo





Tecniche di identificazione

Metodi non invasivi e temporanei

- **Marcatura del pelo o della pelle con colore**
 - Da utilizzare su animali svezzati o adulti (non prima delle 2 settimane di vita)
 - Utilizzare colori atossici
 - Si possono marcare più parti del corpo (pelo, orecchie, coda) ed utilizzare colori diversi per aumentare la numerosità
 - Si può usare anche sui neonati



Criticità

Durata limitata nel tempo
Attenzione al *grooming*



Tecniche di identificazione

Marcatura con pennarelli atossici





Tecniche di identificazione

Metodi invasivi e temporanei

- Iniezione sottocutanea di inchiostro (da non confondere con il tatuaggio)
- Ear tag





Tecniche di identificazione

Marcatura con *Ear tag*





Tecniche di identificazione

Invasivi e permanenti

- Foratura dell'orecchio
- Tatuaggio dell'orecchio
- Tatuaggio della coda
- Micro-tatuaggio
- Micro-tatuaggio con lancet
- Taglio delle falangi
- Microchip



**Report of the Federation of European Laboratory
Animal Science Associations Working Group on
animal identification**

K Dahlborn; P Bugnon; T Nevalainen; M Raspa; P Verbost; E Spangenberg; *Lab Anim*, 2013; 47, 2-11



Tecniche di identificazione

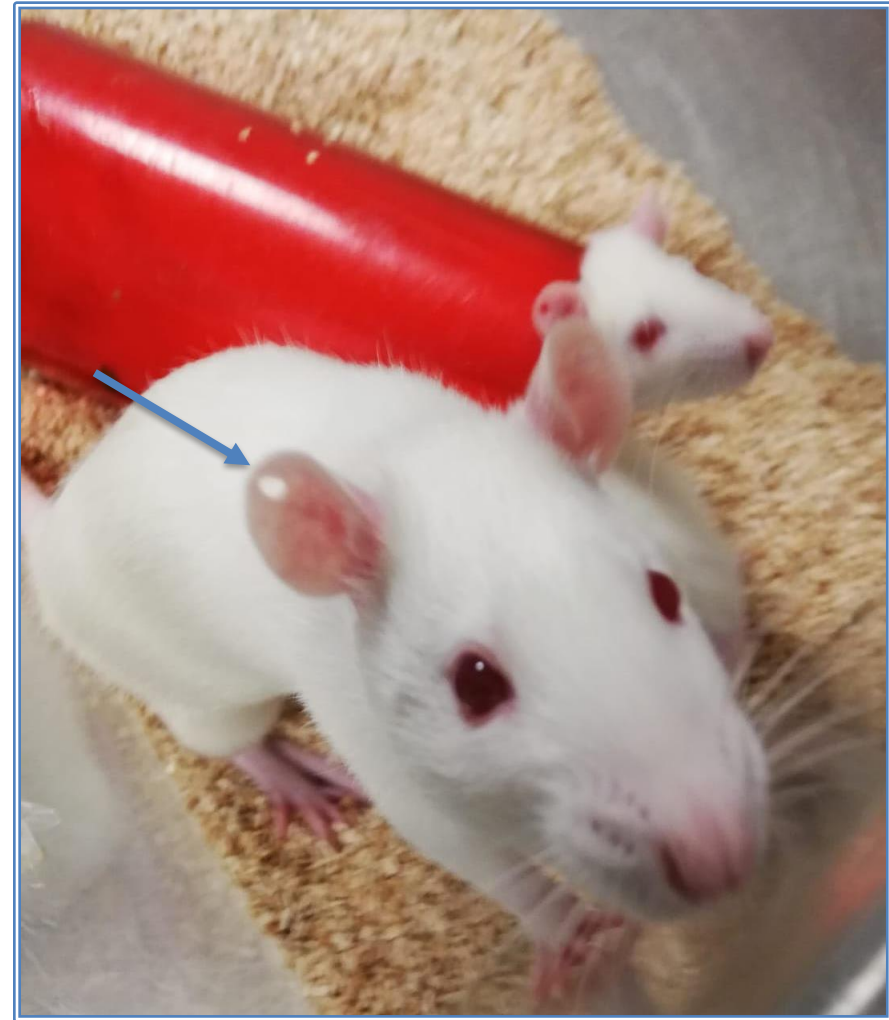
Marcatura con Foratura dell'orecchio

- Da utilizzare su animali svezzati (non prima delle 2 settimane di vita)
- Il foro non deve essere più grande di 1-2mm
- Fornisce materiale per la genotipizzazione



Criticità

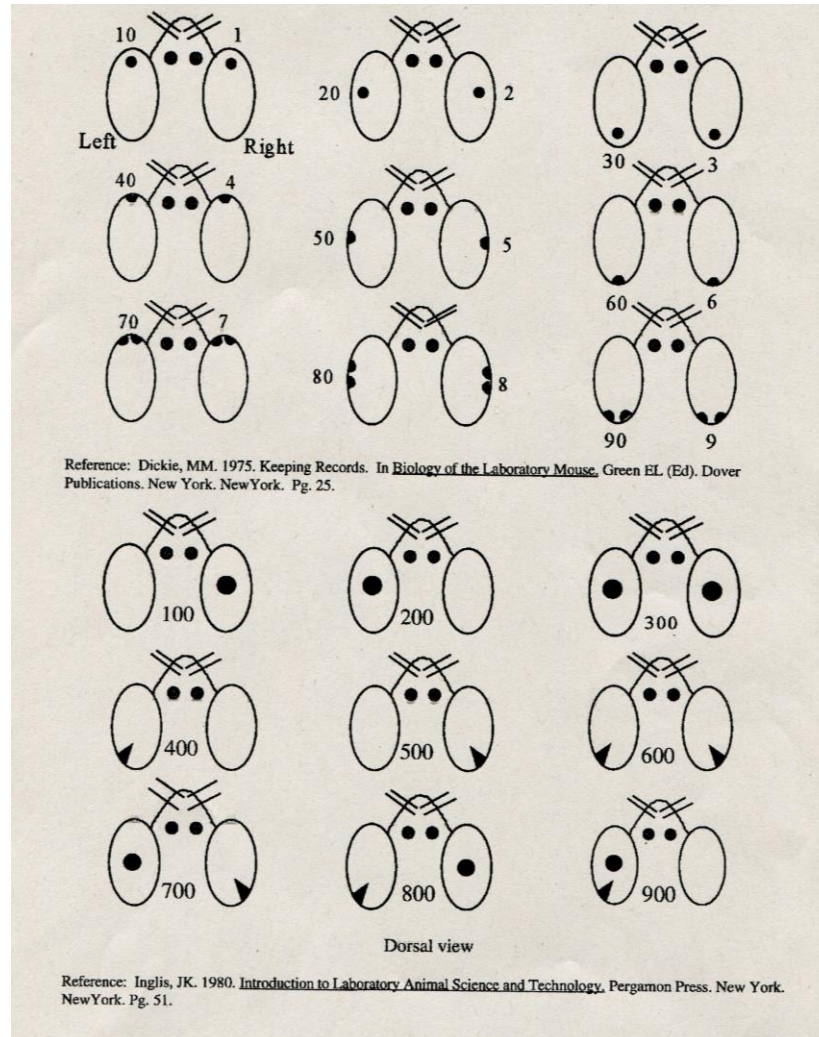
Prestare attenzioni ad eventuali aggressioni e strappi





Tecniche di identificazione

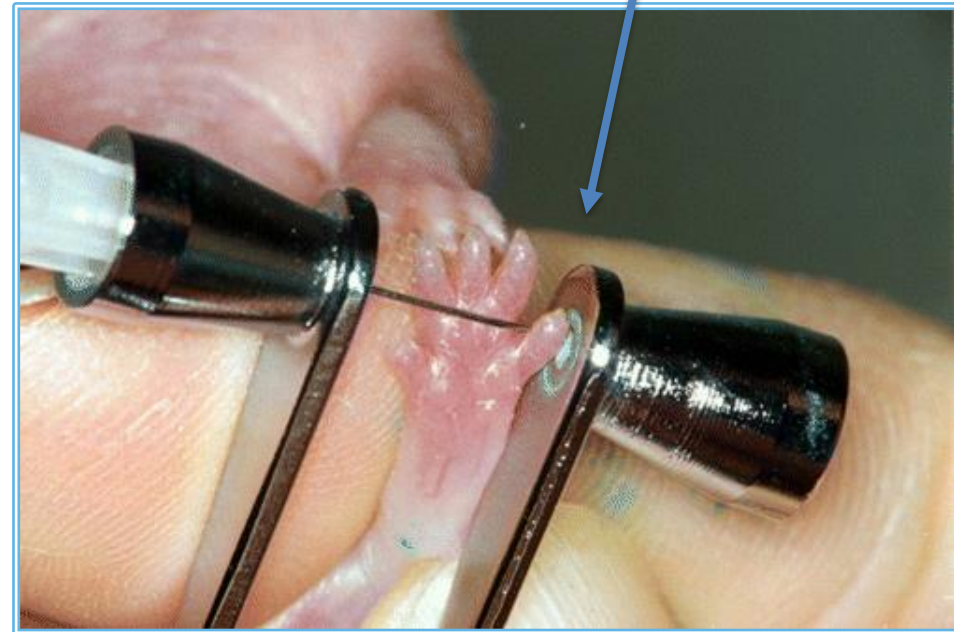
Marcatura con Foratura dell'orecchio



Tecniche di identificazione

Marcatura con Micro-tatuaggio

Si può fare anche utilizzando una lancet





Tecniche di identificazione

Come scegliere?

Tenendo presente:

- La specie
- L'età
- La durata della marcatura
- La sofferenza per l'animale (*anestesia e/o analgesia?*)
- Necessità di fare una genotipizzazione contemporaneamente
- Necessità di identificare molti animali (*sistema numerico*)
- Interferenza/influenza sulla ricerca
- Effetti sulla salute (*es. tossicità del colore*)
- Costi



Gestione
(costi, tempo)



**Benessere
animale**

RICERCA



Tecniche di identificazione

Marcatura con Tatuaggio e Micro-tatuaggio

E' bene ricordare ...

Scegliere adeguatamente la grandezza dell'ago o della lancet

Aghi:

30G per topi allo svezzamento
27G per topi adulti
25G per ratti

Lancet:

3-4 mm per topi < 2 mesi di età
5 mm per topi dai 2 ai 6 mesi di età
5.5 mm per topi > 6 mesi di età

5.5-6 mm per ratti < 3 mesi di età
6-7 mm per ratti dai 3 ai 4 mesi di età
5.5 mm per ratti > 6 mesi di età





Marcatura con taglio delle falangi

E' bene ricordare ...

- Si devono usare forbici molto taglienti
- Effettuare solo su neonati (dai 3 ai 7 giorni di vita)
- Effettuare solo il taglio dell'ultima falange del dito
- Effettuare solo su un dito per zampa
- Fornisce campione per la genotipizzazione





Marcatura con microchip

E' bene ricordare ...

- Va eseguito in anestesia
- Può essere eseguito dai 14 gg di vita
- Tante tipologie di microchip in commercio
- Permette di identificare un alto numero di animali





Tecniche di identificazione

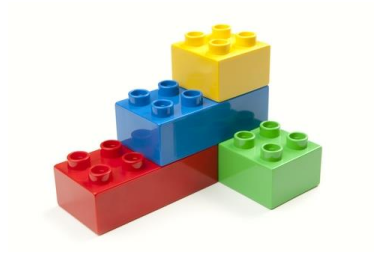
Uso di anestesia e/o analgesia?

E' bene consultarsi con il veterinario per valutazione in base alla scelta del metodo di identificazione.

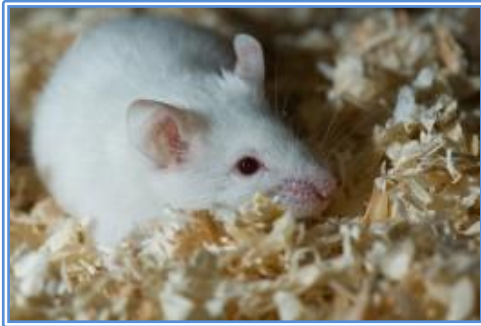
In alcuni casi è consigliabile una anestesia generale gassosa, in altri con anestetici locali rispettando, però, il tempo di azione prima di iniziare con la tecnica.

Una analgesia, anche di breve durata, è sempre consigliata per quei metodi di identificazione più invasivi.

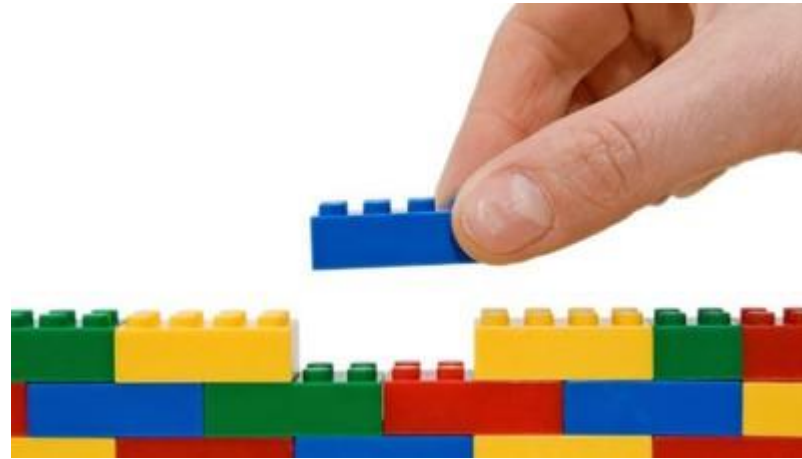




FORMAZIONE



Buona gestione = Buona ricerca



Comunicazione e...



Grazie per l'attenzione

