

POS 1. ACQUISIZIONE E INGRESSO DEGLI ANIMALI

Scopo della presente POS 1 è quello di illustrare le modalità operative per l'approvvigionamento degli animali, al fine di tutelare lo stato sanitario dello stabulario e la corretta applicazione della normativa.

Requisiti Sanitari per l'Ingresso di Zebrafish e Rane presso la sede distaccata del Dipartimento di Biologia

ZEBRAFISH

1. Il fornitore o allevatore da cui si ottengono gli animali dovrà essere esplicitamente indicato nel registro di allevamento o nel progetto di ricerca autorizzato su cui graveranno gli animali stessi. Tutti gli animali sperimentali, zebrafish, che entrano nella sede distaccata CeSAL Dipartimento di Biologia, Laboratorio zebrafish, dovranno provenire da allevamenti autorizzati come stabilimento allevatore o fornitore ai sensi dell'art 20 del D.Lgs.vo 26/2014.
2. La procedura di quarantena è diversificata in base allo stadio di sviluppo a cui gli animali entreranno nello stabulario ed in particolare:

- EMBRIONI: Nel caso dell'entrata di embrioni si procede al bleaching, procedura che permette di evitare il trasferimento di potenziali patogeni.
- ADULTI: Nel caso dell'entrata di individui adulti si procede, previa visita del MVD e di suo controllo dei documenti di ingresso, ad inserirli in una vasca da 1.5L dell'acquario che sarà isolata dal sistema principale, chiudendo la cannellina di collegamento, in modo da creare un ambiente separato. Quotidianamente l'acqua della vaschetta contenente gli individui adulti di nuova entrata sarà sostituita per il 90% con acqua pulita proveniente dall'acquario. L'isolamento durerà 7 giorni trascorsi i quali, se gli individui non hanno mostrato segni di sofferenza o di patologie, previo nullaosta del MVD, saranno integrati nel sistema principale.

3. Procedura operativa per pulizia vaschette e sistema zebrafish

La pulizia delle vaschette viene effettuata con frequenza settimanale come segue:

- Prendere dall'armadio una vaschetta, un coperchio e una barriera blu puliti.
- Mettere la vaschetta sul tavolo e inserire la barriera blu.
- Chiudere nell'acquario, l'acqua corrispondente alla fila del sistema nella quale si trova la/le vaschette da pulire, ruotando di 180° in senso orario la manopola sulla destra.
- Prelevare una vaschetta da pulire. Per minimizzare le perdite d'acqua dal troppo pieno posteriore, prima di prelevare dall'apposito alloggio inclinare con la parte anteriore verso l'alto per far fuoriuscire un po' d'acqua nella fronda di raccolta. Estrarre la vaschetta dal sistema e posizionarla sul tavolo.
- Spostare l'etichetta dalla vaschetta "sporca" a quella pulita posta in precedenza sul tavolo.
- Trasferire l'acqua dalla vaschetta con i pesci a quella vuota con delicatezza. Inizialmente i pesci nuoteranno controcorrente rimanendo nella vaschetta di origine ma al termine del trasferimento scivoleranno nella nuova vaschetta.

- Chiudere la vaschetta con il coperchio pulito e rimetterla subito nell'acquario.
(NB: per evitare confusione tra le vaschette è importante lavorare con una vasca di pesci alla volta sul tavolo.)
 - Prendere la vaschetta sporca e le sue componenti e lavarle sotto il rubinetto, utilizzando solo acqua calda corrente: usare lo spazzolino, posto sopra il lavello, per pulire gli angoli della vasca e i rilievi della barriera blu; usare lo scovolino più piccolo, posto sopra il lavello, per pulire il tubo di scarico della vaschetta e i fori del coperchio.
 - Asciugare la vaschetta.
 - E' possibile usare la vaschetta appena lavata per trasferire i pesci in quella successiva da pulire.
 - Ripetere la procedura di spostamento dell'etichetta, trasferimento dei pesci e pulizia per tutte le vaschette appartenenti alla stessa fila.
 - Una volta terminata la pulizia, riaprire l'acqua corrispondente alla fila agendo sul rubinetto posto a lato.
4. **Smaltimento zebrafish.** Gli zebrafish vengono inseriti in falcon da 50 ml e posti all'interno dell'apposito congelatore, una volta riempita la falcon, gli animali saranno portati nel congelatore posto nella stanza di stabulazione delle rane e smaltiti con il resto delle carcasse.

RANE

1. Le rane in entrata presso il Lab. PhysioLab vengono pescate in aree protette con autorizzazione del Ministero dell'Ambiente e della Sicurezza Energetica (MASE).
2. Documento di trasporto firmato dal responsabile del trasporto.
3. Le rane sono stabulate all'interno di teche di vetro con poca acqua e sassi, sotto ai quali nascondersi, in un clima di semiletargo mantenute tra 4 °C e 8°C all'interno di un frigorifero.
- 3bis. Il MVD viene informato dell'arrivo delle rane con circa una settimana di anticipo. Dopo aver sistemato le rane nelle teche effettua un sopralluogo per verificare il loro stato di salute. In caso di necessità o di riscontro di condizioni sanitarie non conformi è disponibile una teca di quarantena dedicata.
4. Il fotoperiodo del frigorifero sarà controllato da un timer che mantiene luce/buio 12h/12h.
5. Dopo l'eutanasia della rana e il prelievo dei muscoli la carcassa viene chiusa in un guanto e depositata in un frigo congelatore (-20°C) per il successivo smaltimento.
6. Procedura per cambio acqua e ispezione teche:
 - A) Leggere la temperatura del frigo (display sul frigo in basso a sinistra) e annotarla sulla tabella Temperatura frigo espositore collocata sulla parete laterale destra del frigo.
 - B) Far scorrere verso l'alto la tendina del frigo espositore.
 - C) Per le teche che contengono le rane: Aprire il rubinetto della teca e raccogliere l'acqua in un recipiente (si trova vicino al lavandino). Sollevare leggermente e delicatamente la teca dalla parte posteriore per favorire l'uscita dell'acqua, stando attenti a non far spostare i sassi. Chiudere il rubinetto.
 - D) Prendere il recipiente collocato nel ripiano superiore del frigo.
 - E) Sollevare il coperchio della teca e versare lentamente l'acqua nella teca (1-2cm, livello

nero sulla teca). Aprire il rubinetto per far uscire l'acqua. Chiudere il rubinetto e versare di nuovo acqua fino al livello. Ripetere l'operazione fino a quando l'acqua nella teca non è pulita (2-3 volte).

- F) Riempire il contenitore di acqua di rubinetto collocato sopra il lavandino e collocare il contenitore nel ripiano superiore del frigo per il ricambio successivo.
- G) Tirare in basso la tendina del frigo.
- H) Annotare sulla tabella Controllo stabulario rane, situata sulla parete destra del frigo, la data del cambio acqua.
- I) Al termine della sperimentazione, quando non vi sono presenti rane all'interno del frigo si procede con la pulizia delle teche di vetro pulendole accuratamente sotto acqua corrente del lavandino posto di fronte al frigo e debitamente asciugate. Una volta asciutte vengono inserite nuovamente all'interno del frigo.