



Commissione
europea

Amore per gli animali

Verso una scienza migliore

DIRETTIVA **2010/63/EU** DEL PARLAMENTO
EUROPEO E DEL CONSIGLIO, DEL 22 SETTEMBRE 2010, SULLA
PROTEZIONE DEGLI ANIMALI UTILIZZATI A FINI SCIENTIFICI

**QUADRO DI VALUTAZIONE
DELLA GRAVITÀ DELLE
PROCEDURE**

Indice

Documento di lavoro su un quadro di valutazione della gravità	1-22
Esempi volti a illustrare il processo di classificazione della gravità, di valutazione giorno per giorno e di valutazione dell'effettiva gravità	23-77

**Autorità nazionali competenti per l'attuazione della direttiva 2010/63/UE
sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici**

Documento di lavoro su un quadro di valutazione della gravità

Bruxelles, 11-12 luglio 2012

Al fine di agevolare l'attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici, la Commissione ha istituito un gruppo di lavoro di esperti sulla valutazione della gravità delle procedure. Tutti gli Stati membri e le principali organizzazioni delle parti interessate sono stati invitati a nominare esperti per partecipare ai lavori.

Il gruppo di esperti per la valutazione della gravità si è riunito due volte: a dicembre 2011 per prendere in esame in particolare gli animali geneticamente modificati e a maggio 2012 per discutere un quadro generale di valutazione dell'effettiva gravità patita dagli animali sottoposti a procedure scientifiche.

Nel presente documento confluiscono il lavoro svolto nelle due riunioni del gruppo di lavoro, gli scambi di opinioni con gli Stati membri nonché il contributo giuridico fornito dalla Commissione sulla definizione di un quadro di valutazione della gravità, le sue componenti, i partecipanti nonché gli strumenti e i metodi di lavoro. Il documento è stato approvato dalle autorità nazionali competenti in materia di attuazione della direttiva 2010/63/UE nella riunione tenutasi l'11-12 luglio 2012.

Avvertenza:

Le indicazioni che seguono sono fornite a fini orientativi per assistere gli Stati membri e altri soggetti interessati dalla direttiva a raggiungere una comprensione comune delle disposizioni in essa contenute. Tutte le osservazioni devono essere considerate nel contesto della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici.

Alla Corte di giustizia dell'Unione europea spetta la competenza esclusiva, con autorità giuridicamente vincolante, in materia di interpretazione del diritto dell'Unione europea.

Indice

Gli articoli pertinenti della direttiva 2010/63/UE	3
Contesto generale	3
Considerazioni generali ai fini della valutazione della gravità	4
Considerazioni pre-studio	6
Indicatori di gravità.....	6
<i>Macro-categorie</i>	7
<i>Fattori da tenere in considerazione nella valutazione dell'effettiva gravità</i>	8
Come garantire la coerenza nella valutazione e classificazione dell'effettiva gravità	10
<i>Elaborazione di una scheda di valutazione specifica relativa alla procedura</i>	11
<i>Coerenza nella valutazione dell'effettiva gravità</i>	11
Chi dovrebbe fornire contributi alla valutazione dell'effettiva gravità?.....	13
Strumenti di monitoraggio, mezzi di comunicazione e ulteriori considerazioni	13
Appendice I - Glossario delle osservazioni cliniche	15
Appendice II - Bibliografia di base, linee guida e risorse online sulla valutazione del benessere degli animali sottoposti a procedure scientifiche	19

Gli articoli pertinenti della direttiva 2010/63/UE

- **Articolo 4, paragrafo 3:** *"Gli Stati membri assicurano il perfezionamento dell'allevamento, della sistemazione e della cura, e dei metodi usati nelle procedure, eliminando o riducendo al minimo ogni eventuale dolore, sofferenza, angoscia o danno prolungato per gli animali."*
- **Articolo 15, paragrafo 1:** *"Gli Stati membri assicurano che tutte le procedure siano classificate, caso per caso, come "non risveglio", "lievi", "moderate" o "gravi", secondo i criteri di assegnazione di cui all'allegato VIII."*
- **Articolo 16, paragrafo 1, lettera d):** *"[Il riutilizzo] è conforme al parere del veterinario tenendo conto delle esperienze dell'animale nel corso di tutta la sua vita."*
- **Articolo 54 paragrafo 2:** *"Gli Stati membri raccolgono e pubblicano, con cadenza annuale, le informazioni statistiche sull'uso degli animali nelle procedure, comprese le informazioni sull'effettiva gravità delle procedure e sull'origine e le specie di primati non umani utilizzati nelle procedure...."*

Contesto generale

La direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici stabilisce che venga effettuata una valutazione preventiva della gravità di ciascuna procedura nell'ambito di un progetto (articolo 15) e che venga assegnata una classificazione della gravità che può essere "non risveglio", "lieve", "moderata" o "grave". L'allegato VIII fornisce orientamenti sui fattori da considerare nella valutazione della gravità prevista e riporta alcuni esempi per ciascuna categoria di gravità.

L'articolo 54, relativo alle relazioni, impone l'obbligo di comunicare le informazioni statistiche sull'effettiva gravità del dolore, della sofferenza, angoscia o danno prolungato provati dall'animale (anziché la valutazione preventiva, o previsione, della gravità compiuta in fase di valutazione del progetto). Inoltre l'effettiva gravità di qualsiasi procedura precedente costituisce un elemento chiave per stabilire se sia possibile o meno riutilizzare un animale in ulteriori procedure (articolo 16).

Tali disposizioni offrono l'opportunità di migliorare la qualità tanto dal punto di vista scientifico che del benessere attraverso la revisione preventiva delle proposte di progetto e, tenendo conto della sofferenza effettiva patita dall'animale, dovrebbero assicurare una maggiore trasparenza e comprensione dell'impatto delle procedure scientifiche sul benessere degli animali.

Principali vantaggi della valutazione preventiva, del monitoraggio, della valutazione e della registrazione dell'effettiva gravità:

- l'opportunità, in particolare, di attuare misure di perfezionamento e di ridurre la sofferenza, sebbene lo scambio di opinioni preliminare offrirà, in generale, anche l'occasione di valutare se l'uso di animali sia necessario o meno (sostituzione) e se il

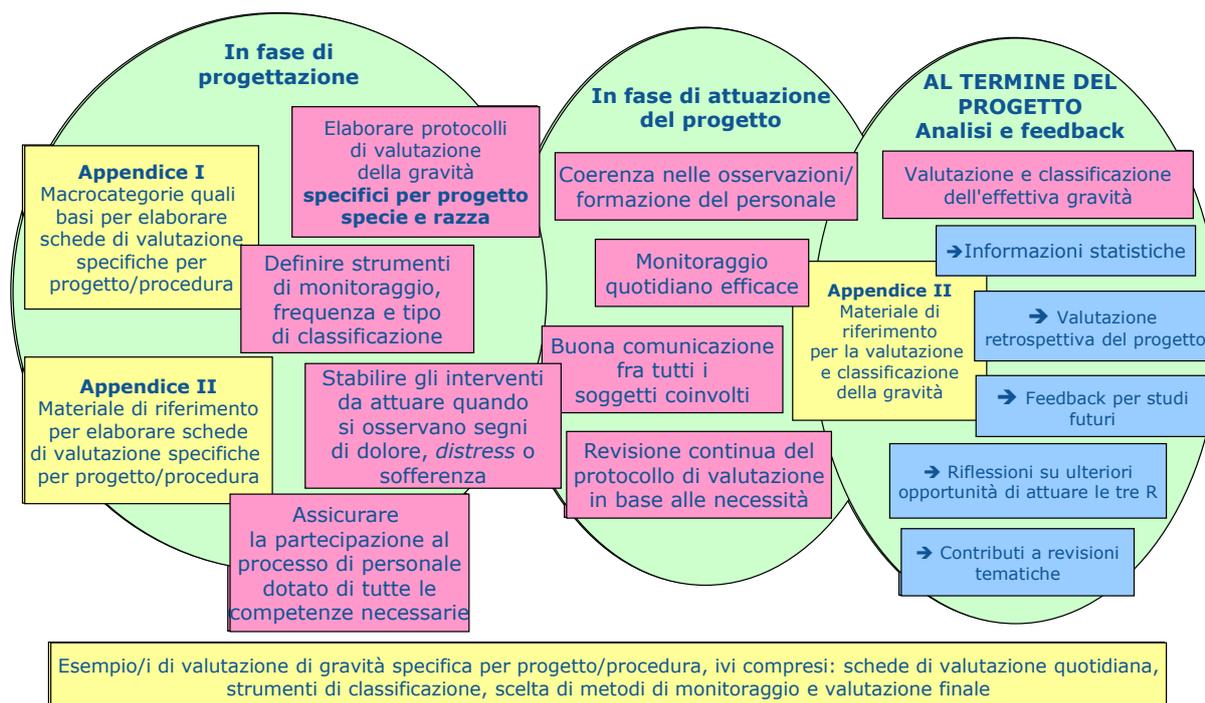
disegno sperimentale dello studio sia atto a ridurre al minimo l'uso di animali (riduzione);

- il miglioramento del benessere degli animali, ad esempio nei casi in cui la sofferenza viene riconosciuta e alleviata più rapidamente;
- la maggiore trasparenza, in quanto le statistiche dovrebbero riflettere gli effettivi costi in termini di benessere per gli animali;
- il miglioramento della comunicazione fra le persone responsabili dell'uso, della cura e del monitoraggio degli animali;
- il contributo alla valutazione retrospettiva del progetto, effettuata al termine della sua esecuzione (articolo 39);
- il miglioramento della qualità scientifica dei dati conseguente al miglioramento del benessere;
- conoscenze più approfondite sulla valutazione della gravità e dei segni clinici che potranno favorire un maggior grado di coerenza nelle valutazioni, purché gli approcci e i risultati siano divulgati, ad esempio attraverso riviste scientifiche, gruppi di discussione e incontri;
- contributi a corsi di formazione destinati a ricercatori, tecnici specializzati e veterinari che si occupano di animali da laboratorio se i risultati saranno utilizzati per fornire esempi;
- informazioni basate sulle evidenze che potranno essere utilizzate in valutazioni preventive dei danni e dei benefici per progetti simili in futuro.

Considerazioni generali ai fini della valutazione della gravità

La considerazione della gravità nell'ambito di una procedura dovrebbe essere un **processo continuo**, che comincia dall'impianto sperimentale dello studio, prosegue con il monitoraggio specifico relativo al singolo studio, condotto quotidianamente sugli animali nel corso del progetto, fino alla valutazione della "effettiva" gravità compiuta al termine dello studio, che può consentire di individuare ulteriori possibilità di perfezionamento in vista di studi futuri.

VALUTAZIONE DELLA GRAVITÀ – UN PROCESSO CONTINUO



Grazie all'adozione di questo approccio, aumentano le possibilità che il principio delle tre R venga tenuto in debita considerazione e applicato sistematicamente, che la comunicazione fra tutti i soggetti coinvolti risulti più efficace e che si pervenga a una maggiore coerenza.

La valutazione della effettiva gravità richiede:

- un approccio di "squadra", con il contributo di persone con competenze, esperienze e priorità diverse, quali i ricercatori, i tecnici specializzati e il personale preposto alla cura, nonché il veterinario incaricato;
- una buona pianificazione;
- livelli adeguati d'istruzione e formazione continua di tutto il personale preposto;
- sistemi di valutazione continua su base giornaliera della gravità specifici in funzione della specie, del ceppo e del progetto, che includano osservazioni informate e strutturate condotte sugli animali a intervalli appropriati (ad esempio aumentando la frequenza durante e dopo le procedure);
- protocolli ben documentati ed efficaci per la valutazione dei comportamenti e dei segni clinici;
- analisi delle osservazioni al fine di formulare un giudizio informato sul tipo e sul grado di sofferenza;
- la consapevolezza del livello di gravità connesso a ciascuna procedura e delle misure da adottare se tale livello viene raggiunto o superato;
- l'adozione di un approccio coerente alle valutazioni complessive dell'effettiva sofferenza (lieve, moderata, grave) ai fini delle comunicazioni statistiche;

- una riflessione sul grado di efficacia raggiunto nell'applicazione del principio delle tre "R" e sulla possibilità di apportare miglioramenti in vista di studi futuri.

Considerazioni pre-studio

Il processo volto a garantire che la gravità sia ridotta al minimo nel corso delle procedure scientifiche inizia in **fase di progettazione**, nel momento in cui ci si interroga se sia o meno necessario e giustificato usare animali vivi per conseguire gli obiettivi scientifici previsti.

- Nei casi in cui l'uso di animali vivi è necessario e giustificato, è importante garantire che sia scelto un modello appropriato e che il disegno sperimentale sia solido.
- Occorre individuare tutti gli aspetti dello studio che possono provocare dolore, sofferenza, angoscia o danno prolungato, considerando in che modo gli effetti possono essere ridotti al minimo, ad esempio consultando la letteratura, i colleghi, i tecnici specializzati, il veterinario e l'organismo preposto al benessere degli animali, se del caso.
- La raccomandata classificazione preventiva della gravità assegnata alle procedure dovrebbe essere basata sulla gravità massima prevista per ciascun animale utilizzato nello studio.
- Dovrebbe essere elaborato un piano di osservazione degli animali che sia idoneo e specifico per lo studio in questione. L'adozione di una terminologia standardizzata e comprensibile da tutti i soggetti coinvolti nello studio migliorerà il grado di coerenza in fase di trasmissione dei dati e di interpretazione;
- È importante assicurare l'adeguata disponibilità di personale qualificato e competente per la conduzione dello studio e per il monitoraggio e la cura degli animali.

Indicatori di gravità

Vi sono comportamenti e segni clinici utilizzabili per valutare la gravità delle procedure a "lato gabbia" (o del vivaio in acqua, del box chiuso, ecc.). La terminologia utilizzata per descriverli dovrebbe essere comprensibile a tutto il personale preposto all'uso, al monitoraggio e alla cura degli animali. Per qualsiasi sistema di valutazione della gravità è essenziale poter contare su solide conoscenze delle condizioni di salute, del comportamento e del benessere normali in relazione alla specie (o ceppo) oggetto di osservazione.

Le finalità dovrebbero essere le seguenti:

- ottenere la migliore qualità di vita possibile per l'animale;
- garantire che qualsiasi sofferenza dovuta alle procedure scientifiche sia individuata e
- ridotta al minimo, ferma restando la coerenza con gli obiettivi scientifici

Qualsiasi sistema di valutazione dovrebbe individuare in maniera efficace l'eventuale deviazione dal normale stato di salute e benessere, consentendo all'osservatore di registrare e fornire una valutazione chiara e sistematica per ciascun animale.

Per stabilire un protocollo di valutazione della gravità che sia specificatamente studiato in funzione della specie, del ceppo, dei singoli animali e della procedura da attuare può essere utilizzato un approccio semplice e gerarchico. Il processo di definizione di un protocollo di valutazione a "lato gabbia" dovrebbe individuare i possibili effetti avversi che si possono verificare nell'intero corso della vita, tenendo conto di elementi quali l'alloggiamento, l'allevamento, la cura e la gestione, nonché gli effetti avversi dovuti alle procedure scientifiche e alle loro conseguenze. Le considerazioni relative a tutti questi effetti avversi dovrebbero mirare ad accertare gli indicatori che possono essere utilizzati al fine di verificare lo stato di benessere a "lato gabbia". Questi indicatori dovranno essere indentificati su misura in considerazione della specie, linea animale, e procedura sperimentale applicata, essere anche facile da comprendere, da identificare e registrare. In ogni caso, è importante assicurare che ci sia anche la possibilità di captare e registrare qualsiasi effetto collaterale mediante scrittura a mano libera.

Macrocategorie

Di seguito viene elencata una serie di categorie generali, o "macrocategorie", applicabili a tutte le specie, quale punto di partenza per la formulazione di un elenco completo di indicatori specifici per ciascuna procedura o programma di gestione degli animali. La finalità è fornire un elenco specifico di ogni studio circa gli indicatori che consentano di ridurre al minimo il rischio che eventuali segni di sofferenza passino inosservati, senza tuttavia incorrere in un sistema troppo complesso, che risulterebbe inutilmente burocratico e dispendioso in termini di tempo.

Le macrocategorie sono:

- aspetto
- funzioni corporee
- ambiente
- comportamenti
- indicatori specifici relativi alla procedura
- osservazioni libere (ulteriori osservazioni pertinenti)

Gli indicatori che rientrano in ciascuna delle suddette categorie possono essere adattati a qualsiasi specie. Dovrebbero essere usati per stilare un elenco di caratteristiche osservabili che possano essere valutate da un soggetto dotato di formazione adeguata, al fine di formulare un giudizio sullo stato generale di salute e di benessere dell'animale.

Tali indicatori dovrebbero essere discussi e selezionati in collaborazione con la persona o le persone responsabili della supervisione del benessere degli animali e con l'organismo preposto al benessere degli animali, se del caso. Gli indicatori dovrebbero quindi essere

utilizzati per mettere a punto sistemi di registrazione specifici "a lato gabbia", impiegati nelle attività quotidiane di osservazione, monitoraggio e valutazione.

L'allegato I fornisce un esempio del modo in cui le macrocategorie summenzionate possono essere articolate ulteriormente e usate per elaborare criteri di osservazione idonei, adottando una terminologia descrittiva condivisa.

L'allegato II fornisce informazioni sulle linee guida e le risorse on-line che possono essere consultate al fine di formulare valutazioni adeguate del benessere degli animali sottoposti a procedure scientifiche.

Fattori da tenere in considerazione nella valutazione dell'effettiva gravità

È importante sottolineare che, a seconda della situazione specifica, una serie di elementi può avere un impatto positivo o negativo sulla gravità e che occorre tenere presente altresì le differenze fra le specie.

La valutazione della effettiva gravità dovrebbe essere effettuata su base individuale, caso per caso, avvalendosi delle osservazioni raccolte presso gli animali nel corso del monitoraggio quotidiano. Si possono eventualmente applicare parametri supplementari necessari ai fini del singolo studio, se disponibili. Ad esempio, per singoli studi possono risultare necessari anche indicatori non osservabili (quali, temperatura corporea, peso corporeo, parametri biochimici o dati biotelemetrici come la frequenza cardiaca) ed essi andrebbero tenuti in considerazione nella valutazione della gravità se possono fornire informazioni supplementari pertinenti.

La severità effettiva da comunicare per il singolo animale dovrebbe corrispondere al livello più elevato registrato nel corso della procedura e non essere riferita alla gravità al termine della procedura. La valutazione non dovrebbe neppure essere considerata alla stregua di un semplice processo additivo, come ad esempio: una serie di procedure lievi = procedura moderata. Dovrebbe essere basata invece su una valutazione complessiva dell'esperienza dell'animale, dall'inizio fino al termine della procedura.

L'elenco riportato di seguito fornisce alcuni esempi del tipo di elementi da considerare e ponderare nel valutare la gravità effettiva.

Procedura, tecnica

- chirurgica/non chirurgica;
- livello e durata del contenimento;
- astensione da analgesia/anestesia quando una di esse o entrambe sarebbero altrimenti necessarie;
- nuovo modello o procedura;
- elementi ambientali (ivi comprese limitazioni relative all'alloggiamento e a cibo/acqua);
- stress/angoscia;
- procedure ripetute e intervalli che intercorrono fra esse; occorre tenere conto anche della frequenza e della combinazione di interventi " sotto soglia");

- riutilizzo o uso continuato.

Specie, ceppo, stadio di sviluppo, esperienze precedenti

- **Considerazione della massima importanza: per poter prevedere e valutare in modo efficace la gravità è necessario comprendere la biologia e il comportamento della singola specie e ceppo (e talvolta del singolo animale);**
- **specie e ceppo;**
- origine dell'animale, ad esempio animale da allevamento, randagio o selvatico;
- provenienza (ivi comprese le condizioni di alloggiamento) e trasporto;
- genotipo, fenotipo, sesso, età, stato immunitario;
- comportamento naturale e caratteristiche biologiche (ad esempio l'importanza relativa dei vari sensi, quali la vista per i primati e l'olfatto per i roditori, e il modo in cui possono essere alterati in un ambiente di laboratorio);
- sistemazione individuale o in gruppo: giustificazione della sistemazione individuale degli animali sociali o della separazione a breve o a lungo termine di questi ultimi dai gruppi stabiliti;
- ritmi diurni: ad esempio l'impatto delle procedure scientifiche o di manutenzione su animali notturni durante le ore di luce;
- separazione materna in tutte le specie, compresi i roditori;
- capacità cognitive, consapevolezza, memoria, percezione degli effetti delle procedure.

Frequenza, intensità

- Non vi è un nesso diretto fra la frequenza e la gravità: l'aumento della frequenza non determina necessariamente una maggiore gravità in quanto l'effetto della ripetizione delle procedure o delle tecniche sulla gravità dipende da una serie di fattori, quali l'intensità di ciascun intervento, la sua durata, la specie di appartenenza e l'esperienza del singolo animale.
- Quando gli interventi sono ripetuti, vi sono potenzialmente le condizioni per l'acclimatazione, che può ridurre la gravità, ad esempio in primati non umani sottoposti a procedure lievi. Viceversa, la ripetizione può aumentare la gravità, ad esempio a causa dell'anticipazione di una procedura stressante, o l'insorgenza di iperalgesia in caso di intervento chirurgico.
- Potenzialmente si può instaurare un addestramento basato sul rinforzo positivo, ossia su "ricompense" dopo le procedure.
- Va registrato il livello massimo di gravità anziché il livello di gravità di "convalescenza".

Durata dell'effetto

- La durata è *collegata* all'intensità (*e quindi alla gravità*).
- Possibilità di utilizzare punti finali umanitari (*humane end point*) o scientifici in fase precoce.

Efficacia del perfezionamento

- analgesia, anestesia e assistenza post-operatoria adeguate;
- arricchimento: sia arricchimento ambientale che alloggiamento in gruppo degli animali sociali;
- alloggiamento, allevamento e cura: valutare se è possibile perfezionarli secondo le buone pratiche o se la procedura richiede limitazioni, quali il confinamento in gabbie di dimensioni più ridotte (ad esempio le gabbie metaboliche), pavimenti grigliati o esposizione a condizioni ambientali che possono provocare stress;
- addestramento dell'animale a cooperare o metodi per favorire l'adattamento alle procedure;
- efficacia dei protocolli di valutazione a "lato gabbia".

Gravità cumulativa

- Nell'ambito di una procedura che comporta una serie di stadi/interventi si deve tenere conto dell'esperienza complessiva dell'animale nel corso della sua vita, ivi compresi elementi quali le limitazioni alla capacità di perfezionare l'alloggiamento o la necessità di frequenti operazioni di cattura, manipolazione, contenimento, eccetera che possono influire sulla gravità;
- procedure pregresse, in caso di riutilizzo;
- nel valutare la possibilità di riutilizzo occorre tenere conto dell'esperienza complessiva dell'animale nel corso della sua vita, ivi compresi aspetti quali la provenienza (ad esempio lo "svezzamento" precoce) e il trasporto.

Come garantire la coerenza nella valutazione e classificazione dell'effettiva gravità

In fase di progettazione dello studio è generalmente necessario il contributo dei ricercatori competenti, dei tecnici specializzati, dei veterinari e del personale incaricato della cura, al fine di assicurare la disponibilità di dati idonei a consentire una decisione informata sulla effettiva gravità al termine della procedura. L'assegnazione finale della categoria relativa alla effettiva gravità risulterà dall'analisi delle registrazioni delle osservazioni, effettuate a "lato gabbia", del comportamento, dei sintomi clinici e di altri parametri rilevanti.

Fra gli elementi che concorrono ad assicurare la coerenza figurano:

- l'integrazione di molteplici competenze, esperienze e priorità, ossia l'adozione di un "approccio di squadra";
- la formazione sull'utilizzo del protocollo di valutazione quotidiana (ivi compresa la terminologia comune adottata per descrivere le osservazioni);
- le competenze specifiche sulla salute, il benessere e il comportamento degli animali;
- la revisione periodica degli esiti;
- la comunicazione fra tutti i responsabili della conduzione dello studio e del monitoraggio degli animali (*top-down, bottom-up, tra e intra*);

- la supervisione (a livello locale - ad esempio, organismo preposto al benessere animale -, regionale, nazionale, dell'UE).

Nella valutazione dell'effettiva gravità occorre tenere conto dei seguenti aspetti chiave:

Elaborazione di una scheda di valutazione specifica relativa alla procedura

- Preliminarmente all'avvio del progetto dovrebbero essere predisposte e concordate schede di valutazione specifiche in funzione della specie, del ceppo e dello studio;
- nell'elaborazione delle schede di valutazione specifiche relative allo studio dovrebbero essere utilizzate in maniera efficace tutte le informazioni pertinenti disponibili, quali ad esempio: esperienze precedenti, risultati di studi *in vitro* o *in silico*, consultazione della letteratura scientifica, informazioni fornite da studi pilota e segni clinici osservati negli esseri umani o in altri animali;
- le informazioni su quali parametri devono essere oggetto di osservazione e sulle modalità di esecuzione del monitoraggio dovrebbero essere disponibili a "lato gabbia";
- sarà la classificazione del livello di gravità prevista "a dettare" in parte il grado di coinvolgimento richiesto sul piano operativo, la necessità o meno di adottare un approccio di squadra durante il monitoraggio e quali soggetti saranno effettivamente chiamati a eseguire le osservazioni e il processo di registrazione; coloro che hanno elaborato il protocollo di valutazione specifico relativo allo studio dovrebbero condurre e/o confermare l'assegnazione del livello di effettiva gravità finale;
- a seconda della complessità dello studio, può essere utile utilizzare schede di valutazione distinte per le singole componenti: ad esempio schede standard di assistenza chirurgica/perioperatoria possono essere usate in combinazione con protocolli ad hoc per lo studio;
- in alcuni casi, le schede di valutazione specifiche relative allo studio potrebbero comprendere anche informazioni pertinenti ai fini della gestione di colonie, ad esempio dati relativi all'allevamento e alla crescita di animali geneticamente modificati.

Coerenza nella valutazione dell'effettiva gravità

La valutazione dell'effettiva gravità viene effettuata al termine della procedura e richiede che venga espresso un giudizio sulla gravità complessiva patita dall'animale, sulla base delle valutazioni compiute di giorno in giorno e tenendo conto delle procedure condotte.

- Un approccio adottato comunemente è quello di definire i livelli "lieve", "moderato" e "grave" per ciascuno degli indicatori utilizzati nelle valutazioni effettuate di giorno in giorno e poi formulare un giudizio sulla gravità delle stesse caso per caso;

- **Così come nel caso del monitoraggio eseguito quotidianamente, è essenziale che i criteri di valutazione effettiva siano predisposti specificatamente per la singola procedura, specie e ceppo;** ad esempio, un calo ponderale del 10% avrà implicazioni alquanto diverse per la salute e il benessere di un ratto giovane, in fase di crescita, di un topo adulto con un tumore in rapida crescita o di un cane adulto;
- un altro fattore essenziale da tenere in considerazione è il lasso di tempo nell'arco del quale si riscontrano alcuni di questi indicatori, in particolare per quanto riguarda il calo ponderale e il consumo di cibo/acqua.

La valutazione verrà effettuata utilizzando le registrazioni quotidiane, tenendo conto della procedura condotta sull'animale, della durata degli effetti avversi e del riutilizzo o meno dell'animale. Sebbene essa comporti inevitabilmente un certo grado di soggettività, un'adeguata formazione dell'osservatore dovrebbe mirare a ridurre tale componente soggettiva.

Assegnazione del grado di effettiva gravità nel caso di animali trovati morti

- Se un animale è trovato morto, ossia non è stato sottoposto a eutanasia, il decesso può essere una conseguenza della procedura sperimentale o di altre cause indipendenti da essa¹.
- L'effettiva gravità nel caso di animali trovati morti dovrebbe essere classificata come "grave", a meno che si possa stabilire con decisione informata che l'animale non ha patito gravi sofferenze prima della morte.
- Se è improbabile che la morte sia stata preceduta da gravi sofferenze, la classificazione dell'effettiva gravità dovrebbe riflettere l'esperienza nota precedente al decesso. Occorrerà tenere in debita considerazione fattori quali la frequenza del monitoraggio, il ricorso ad analgesia, eccetera.
- Un "danno (prolungato)" può essere patito soltanto da un animale vivo.

Devono essere elaborati e divulgati presso la comunità scientifica esempi volti a illustrare il processo di classificazione della gravità, di valutazione continua (giorno per giorno) e di valutazione finale dell'effettiva gravità.

¹ Ai fini delle comunicazioni statistiche, l'effettiva gravità dovrebbe essere riferita primariamente alla gravità delle procedure sperimentali e non a incidenti indipendenti da esse quali, ad esempio, epidemie o allagamento della gabbia. Questo tipo di incidenti connessi a problemi di salute o a pratiche di gestione e cura degli animali e non ai danni prodotti dalle procedure dovrebbero comunque essere registrati, investigati ulteriormente e monitorati al fine di prevenire che si ripetano.

Chi dovrebbe fornire contributi alla valutazione dell'effettiva gravità?

- Spesso l'osservazione e la registrazione degli effetti sono processi separati dalla classificazione dell'effettiva severità.
- Occorre definire in modo chiaro le responsabilità al fine di garantire l'efficace monitoraggio quotidiano degli animali, assicurando supporto e supervisione adeguati.
- Dovrebbe essere predisposto un processo di verifica finalizzato a promuovere la coerenza, ad esempio confrontando i punteggi di valutazione assegnati da persone diverse.
- I ruoli relativi all'osservazione e al monitoraggio degli animali e all'esecuzione delle valutazioni dell'effettiva gravità dovrebbero essere flessibili e adattabili a seconda della complessità e gravità dello studio in questione, sebbene la responsabilità giuridica di garantire che la sofferenza sia individuata e ridotta al minimo resta della persona menzionata nell'autorizzazione del progetto.
- Anche gli organismi preposti al benessere animale dovrebbero svolgere un ruolo a livello di stabilimento per garantire la coerenza;
- I comitati e le autorità nazionali competenti possono contribuire ulteriormente a promuovere la coerenza.

Strumenti di monitoraggio, mezzi di comunicazione e ulteriori considerazioni

- L'utilizzo di schede di registrazione dei punteggi (*score sheets*) va tenuto in considerazione in fase di pianificazione del progetto.
- Le schede di registrazione dei punteggi dovrebbero essere il più semplice possibile, ma anche sufficientemente dettagliate, e formulate ad hoc per il tipo di studio da effettuare.
- Possono essere utilizzate schede di valutazione elaborate in precedenza, purché idonee allo studio, alla specie e al ceppo.
- L'uso di strumenti elettronici per la registrazione dei dati può contribuire ad assicurare la coerenza e la facilità di accesso a tutte le informazioni pertinenti.
- Si raccomanda l'adozione di un linguaggio e di una terminologia standardizzati.
- I dati registrati dovrebbero essere il più oggettivi possibile.
- I vantaggi e gli svantaggi di: i) metodi basati su punteggio numerico e ii) sistemi di osservazione "binari" (in cui gli indicatori sono segnati come "presenti" o "assenti") vanno esaminati caso per caso.
- Tutti i tipi di registrazione delle osservazioni dovrebbero comprendere una sezione per l'aggiunta di testi liberi, oltre agli indicatori predeterminati, per consentire l'annotazione di osservazioni impreviste;

- È essenziale assicurare a tutti i membri del personale preposto un'efficace formazione che comprenda specificatamente la valutazione della gravità e del benessere nonché le tecniche di monitoraggio;
- Occorre predisporre un piano di comunicazione rivolto a tutti i membri del personale preposto, che preveda un meccanismo per comunicare rapidamente eventuali esiti inattesi a tutti i soggetti interessati e, se del caso, alle autorità competenti;
- Il monitoraggio dovrebbe essere commisurato agli effetti previsti: le procedure che potrebbero provocare sofferenze "gravi" richiederanno generalmente un monitoraggio più frequente e approfondito;
- Dovrebbero vigere criteri chiari di intervento, ad esempio, se vengono osservati particolari parametri o se ci si sta avvicinando a un livello di sofferenza predeterminato. Tutti i membri del personale preposto dovrebbero sapere quali sono questi criteri, che cosa fare e chi contattare nel caso in cui si verificano le condizioni previste.

Se il processo di valutazione della gravità verrà attuato in maniera efficace, gli animali e tutto il personale preposto alla cura e all'utilizzo degli animali stessi potranno beneficiare dei progressi compiuti sul piano del benessere animale, della validità scientifica e della trasparenza.

Una buona comunicazione interna ed esterna sul processo di valutazione della gravità e sull'applicazione del principio delle tre R apporterà benefici di portata ancora maggiore.

Appendice I

Glossario delle osservazioni cliniche

L'adeguatezza di qualsiasi piano di valutazione della gravità dipende dalla selezione di indicatori di benessere che:

- siano riconoscibili in modo immediato e affidabile;
- siano efficaci nel fornire misurazioni adeguate del benessere;
- siano pertinenti in relazione allo studio scientifico, alla specie e alla razza (se del caso);
- siano agevoli da applicare e non arrechino eccessivo disturbo per l'animale;
- si prestino a misurazioni, interpretazioni e analisi coerenti.

L'adozione di un approccio condiviso alla registrazione delle osservazioni cliniche è quindi un obiettivo auspicabile in quanto contribuisce alla formulazione di approcci coerenti alla classificazione della gravità. Ciò può consentire un più agevole confronto dei risultati clinici ottenuti nei vari studi e l'informazione dei soggetti coinvolti nella valutazione della gravità.

Le osservazioni sono articolate nelle sei seguenti macro-categorie:

Aspetto/Funzioni corporee/Ambiente/Comportamenti/Indicatori procedura-specifici/Osservazioni libere

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
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>

		<i>vocalizzazioni dei conigli sono in genere inaudibili per l'orecchio umano, a meno che l'animale non sia in stato di distress).</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.	

Appendice II

Bibliografia di base, linee guida e risorse online sulla valutazione del benessere degli animali sottoposti a procedure scientifiche

American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM) (2006) *Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits*, disponibile al seguente indirizzo Internet <http://www.tinyurl.com/65ez5vh>

Assessing the Health and Welfare of Laboratory Animals (AHWLA) training resource. Cfr. <http://www.ahwla.org.uk/index.html>

Canadian Council on Animal Care (CCAC) *Welfare assessment*. Cfr. <http://www.ccac.ca/> e cliccare su "Three Rs", poi ricercare 'welfare assessment' (inglese o francese)

Categorising the severity of scientific procedures on animals - Summary and reports from three round-table discussions edited by A. Smith e Maggy Jennings on behalf of the Boyd Group e RSPCA, July 2004

Publicato da RSPCA Research Animals Department

FELASA Working Group on the Reporting of Clinical Signs in Laboratory Animals (2012) – (in corso di stampa)

Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (2008) *Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press

Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (2009) *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press. Cfr. http://dels.nas.edu/animal_pain/

Johansen R, Needham JR, Colquhoun DJ, et al. (2006) Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. *Laboratory Animals* **40**: 323–340

Joint Working Group on Refinement (2011) A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals. *Laboratory Animals* **45**: 1-13

Leach MC et al. (2008) Identification of appropriate measures for the assessment of laboratory mouse welfare. *Animal Welfare* **17**: 161-170

National Centre for the Three Rs (NC3Rs) *Welfare assessment*. Cfr. <http://www.nc3rs.org.uk/welfareassessment>

National Health and Medical Research Council (2008) *Guidelines to Promote the Wellbeing of Animals Used for Scientific Purposes: The Assessment and Alleviation of Pain and*

Distress in Research Animals. Canberra: Australian Government. Cfr. <http://www.nhmrc.gov.au> e cercare "pain and distress"

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation*. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 19. Paris: OECD

Wells DJ, Playle LC, Enser WEJ, et al. Assessing the welfare of genetically altered mice. Versione completa disponibile all'indirizzo Internet <http://www.nc3rs.org.uk/gamice>. Sintesi in *Laboratory Animals* **40**: 111–114

Workman P et al. (2010) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* **102**: 1555-1577, disponibile all'indirizzo Internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883160/?tool=pubmed>

1.2 Riviste scientifiche consigliate per ulteriori approfondimenti

<i>Applied Animal Behaviour Science</i> (Etologia animale applicata)	http://www.applied-ethology.org/applied_animal_behaviour_science.html
<i>Animal Technology and Welfare</i> (Tecnologia e benessere degli animali)	http://www.iat.org.uk/publications/atw.htm
<i>Animal Welfare</i> (Benessere animale)	http://www.ufaw.org.uk/animal.php
<i>Argomenti di attualità in Laboratory Animal Science e Journal of the American Association for Laboratory Animal Science</i>	http://www.aalas.org/publications/index.aspx#ct
<i>Lab Animal e Lab Animal Europe</i>	http://www.labanimal.com/labanimal/index.html http://www.labanimaleurope.eu/
<i>Laboratory Animals</i>	http://la.rsmjournals.com/

1.3 Parole chiave suggerite per la consultazione della letteratura sull'argomento

Le seguenti parole chiave possono essere utili nella ricerca di informazioni sulla valutazione della gravità:

effetti avversi	valutazione dei danni e dei benefici	indicatori positivi	scala di gravità
benessere animale	punti finali umanitari (<i>human endpoints</i>)	benessere positivo	<i>sickness behaviour</i> (comportamento disfunzionale/da animale malato)
sofferenza animale	Bisogni	valutazione qualitativa del comportamento	stress
valutazione	Valutazione oggettiva	qualità della vita	sofferenza
disagio	Dolore	perfezionamento	valutazione del benessere
distress/ angoscia	valutazione del dolore	schede di registrazione del punteggio (<i>scoring sheets</i>)	indicatori del benessere
valutazione del danno	misurazione del dolore	sistema di valutazione a punteggio	esiti del benessere

Bibliografia sulla classificazione in funzione della gravità effettiva

CCAC (1998) *Guidelines on: Choosing an Appropriate Endpoint in Experiments Using Animals for Research, Teaching and Testing*. Canadian Council on Animal Care, disponibile all'indirizzo Internet: http://www.ccac.ca/en/_standards/guidelines (inglese) e http://www.ccac.ca/fr/_normes/lignes_directrices (francese)

FELASA Working Group on Pain and Distress (1994) Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. *Laboratory Animals* **28**: 97-112

Jones HRP, Oates J and Trussell BA (1999) An applied approach to the assessment of severity. In: Hendriksen CFM. & Morton DB (eds), *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research*. Proceedings of the International Conference, 22-25 November 1998, Zeist, The Netherlands. Royal Society for Medicine Press Ltd., London pp 40-47

LASA/APC (2008) *Final Report of a LASA/APC Working Group to Examine the Feasibility of Reporting Data on the Severity of Scientific Procedures on Animals*. Disponibile all'indirizzo Internet: <http://www.lasa.co.uk/publications.html>

Morton, DB and Hau J (2011) Chapter 18: Welfare assessment and humane endpoints. In *Handbook of Laboratory Animal Science, 3rd Edition, Volume 1 Essential Principles and Practices*. Hau J and Schapiro, SJ (eds), CRC Press LLC, USA, pp 535-572

Prescott MJ, Morton DB, Anderson D, Buckwell A, Heath S, Hubrecht R, Jennings M, Robb D, Ruane B, Swallow J and Thompson P (2004) Refining dog husbandry and care, Eighth report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals* **38 Suppl 1**: S1:1-S1:94

Wolfensohn S and Lloyd M (2003) *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, 3rd Edition*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford (4a edizione in corso di preparazione)

(Ultima visualizzazione di tutti i siti Internet: 24 maggio 2012.)

Esempi volti a illustrare il processo di classificazione della gravità, di valutazione giorno per giorno e di valutazione dell'effettiva gravità

Bruxelles, 11 gennaio 2013

Nel *documento di lavoro su un quadro di valutazione della gravità* elaborato dal gruppo di lavoro di esperti della Commissione europea e approvato dalle autorità nazionali competenti in materia di attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici nella riunione tenutasi l'11-12 luglio 2012, si raccomandava che venissero elaborati e divulgati presso la comunità scientifica esempi volti a illustrare il “processo di classificazione della gravità, valutazione giorno per giorno e valutazione finale dell'effettiva gravità”.

A seguito di tale raccomandazione, il gruppo di lavoro di esperti ha prodotto una serie di esempi per chiarire in che modo il processo descritto nel *documento di lavoro* può essere applicato a procedure diverse. Tali indicazioni sono fornite al fine di aiutare le autorità competenti, gli utilizzatori, i tecnici specializzati, i veterinari e tutto il personale preposto, a garantire che il dolore, la sofferenza e l'angoscia (*distress*) degli animali siano efficacemente previsti, riconosciuti, alleviati laddove possibile, e valutati in maniera coerente per tutta la durata delle procedure. Il presente documento è stato approvato dalle autorità nazionali competenti in materia di attuazione della direttiva 2010/63/UE nella riunione svoltasi il 23-24 gennaio 2013.

Nell'utilizzare gli esempi è fondamentale tenere conto di alcuni importanti fattori esposti di seguito.

- Si presuppone che in maniera sistematica **vengano attuate buone pratiche** in relazione ai seguenti aspetti: l'alloggiamento, la gestione e la cura; le procedure di perfezionamento; l'istruzione e la formazione; la competenza nella valutazione; la ricerca e l'applicazione di informazioni aggiornate riguardo alla sostituzione, la riduzione e il perfezionamento; l'impianto sperimentale.
- Il tipo di schede di valutazione inserite negli esempi mira a **integrare – non a sostituire – il giudizio formulato da personale qualificato, competente ed empatico**. L'obiettivo è raggiungere una maggiore sistematicità e obiettività nell'osservazione, registrazione e valutazione della sofferenza senza con ciò volersi sovrapporre al giudizio dei professionisti.

- Ciascun esempio è riferito a una **situazione ipotetica ma realistica**. Non sarebbe opportuno includere tutti i dettagli disponibili nella pratica, ma vengono fornite informazioni sufficienti **al fine di spiegare le modalità di attuazione del processo**.
- Come è stato sottolineato nel *documento di lavoro*, è fondamentale che **la valutazione della gravità sia concepita e predisposta specificatamente** in relazione alla specie, al ceppo e alla procedura così come viene condotta presso lo stabilimento del singolo utilizzatore. Su tale base, il gruppo di esperti **sconsiglia vivamente di utilizzare** nella loro forma attuale i sistemi di schede e tabelle di classificazione fornite negli esempi, **anche se già predisposte per le stesse procedure**. Tutti i protocolli di valutazione della gravità dovrebbero essere sottoposti periodicamente a revisione per verificarne l'efficacia ed essere modificati in base alle necessità.
- Gli **stessi esempi sono soggetti a revisione**, via via che si acquisiscono maggiori conoscenze sugli indicatori di dolore, sofferenza e *distress* e con l'evoluzione degli approcci alla valutazione e classificazione della gravità. Ciascun esempio riporta la data; per gli aggiornamenti si rinvia al sito Internet della Commissione europea:
http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animali/interpretation_en.htm
- **Saranno benaccetti feedback** sull'utilità degli esempi e suggerimenti su ulteriori procedure da inserire; si prega di inviare i commenti all'indirizzo: env-laboratory-animali@ec.europa.eu

Indice

Modello 1 – Studi di oncologia	26
<i>Modello 1(a) - Mantenimento di linee cellulari tumorali umane in topi nudi immunocompromessi</i>	27
<i>Modello 1(b) Efficacia di nuovi agenti farmacologici sulla crescita dei tumori</i>	32
Modello 2 – Encefalite autoimmune sperimentale (EAE) nel topo	37
Modello 3 – Artrite	46
Modello 4 – Ictus	54
Modello 5 – Produzione di anticorpi policlonali nel coniglio	63
Modello 6 - Produzione e mantenimento di animali geneticamente modificati	68
<i>Modello – GeneA^{tm1a(Funding)Lab}</i>	69
<i>Modello –Tg(GeneB)^{Labcode}</i>	74
<i>Modello – GeneC^{tm1a(Funding)Lab}</i>	76

Esempi volti a illustrare il processo di classificazione della gravità

Modello 1 – Studi di oncologia (1a e 1b)

Ultimo aggiornamento: 5 febbraio 2013

1. Modelli animali in studi di oncologia (1a e 1b)

Contesto generale: valutazione in vivo di nuovi agenti antitumorali

Il cancro è una delle principali cause di morte nei paesi sviluppati e l'invecchiamento della popolazione è destinato inevitabilmente a provocare l'ulteriore aumento dell'incidenza della malattia. Nel 2010 la probabilità di morte per cancro nell'UE prima dei settanta anni d'età era di una a sette. Si pone pertanto l'esigenza di sviluppare farmaci nuovi e più efficaci per la cura dei tumori. Fra i benefici attesi vi sono la riduzione della mortalità per cancro e il miglioramento della qualità della vita per i malati di cancro in futuro.

Nello sviluppo di nuovi farmaci per la cura del cancro vengono usati attualmente modelli animali, oltre a sistemi di modellizzazione computerizzata e a metodologie in vitro come i saggi di colture cellulari. Una volta confermata in vitro la selettività e attività dei composti, sugli animali vengono testati soltanto i composti che presentano caratteristiche favorevoli. Gli studi di tollerabilità sono condotti su piccoli gruppi di animali allo scopo di stabilire la dose massima tollerata (DMT) e l'adeguatezza del regime di dosaggio prima di condurre studi di efficacia su scala più vasta.

La gravità degli effetti sugli animali dipenderà dai modelli e dalla finalità dello studio. Ad esempio il mantenimento di linee cellulari tumorali non dovrebbe avere un impatto significativo sul benessere a condizione che si rispettino le buone pratiche per tutto il corso della sperimentazione, prevedendo un adeguato monitoraggio degli animali e l'adozione di punti finali umanitari precoci (early humane end-points). È probabile tuttavia che gli studi volti a valutare nuovi trattamenti in modelli metastatici possano risultare più problematici dal punto di vista del benessere, considerando lo sviluppo di tumori multipli e i probabili effetti collaterali dei farmaci citotossici.

Sono state pubblicate varie linee guida per il benessere e l'uso di animali nell'ambito della ricerca sul cancro, ad esempio nel *British Journal of Cancer* (Workman et al. 2010). Esse forniscono un quadro dettagliato dei vari modelli tumorali animali disponibili, del loro impatto sugli animali e dei modi in cui si può ridurre al minimo la sofferenza.

Di seguito vengono riportati due esempi che illustrano alcuni modelli animali impiegati in oncologia con classificazioni della gravità.

Riferimenti

Workman et al. (2010) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* (2010) 102(11), 1555 – 1577; disponibile gratuitamente all'indirizzo Internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883160/pdf/6605642a.pdf>

1 (a) - Mantenimento di cellule tumorali umane in topi nudi immunocompromessi

Alcune linee di cellule tumorali umane non si replicano in maniera affidabile in vitro e vi è talvolta l'esigenza di caratterizzare e mantenere linee cellulari umane in un modello xenogenico *in vivo*.

Studio

A 30 topi maschi BALB/C nudi verranno iniettati sul fianco sinistro 10^3 di sospensione cellulare HCT 116 in soluzione salina 0,1 ml. Gli animali saranno stabulati in gabbie ventilate individualmente (IVC) con lettiera e materiale per i nidi. Il benessere degli animali sarà valutato quotidianamente e gli animali saranno pesati ogni 4 giorni. I singoli animali saranno sottoposti a palpazione a giorni alterni per l'individuazione di tumori e tutti i tumori individuabili saranno misurati con calibri, sempre a giorni alterni. Gli animali saranno sottoposti a eutanasia il giorno 15 per l'asportazione del tumore.

Valutazione preventiva iniziale, considerazione di perfezionamenti specifici e punti finali umanitari

Quali interventi devono essere effettuati sugli animali utilizzati in questo studio?	Che cosa proveranno gli animali? Quanta sofferenza potrebbero provocare le procedure? Che cosa potrebbe aggravare la sofferenza?		In che modo verrà ridotta al minimo la sofferenza?	
	Effetti avversi	Metodologia e interventi	Punto finale	
Mantenimento di topi immunocompromessi	Gli animali sono soggetti a infezioni	Animali stabulati in gabbie ventilate individualmente e sottoposti a pratiche di gestione mirate per ridurre al minimo il rischio di contaminazione. Stabulati in gruppi e dotati di materiale di arricchimento ambientale per ridurre lo stress. Le modalità di gestione e di cura saranno modificate nel caso in cui si osservino segni di distress, aggressione o comportamenti anomali	Sarà soppresso qualsiasi animale che mostri segni di decadimento delle condizioni di salute	
Iniezione sottocutanea di cellule tumorali	Disagio transitorio a seguito dell'iniezione	L'iniezione verrà effettuata una sola volta	Gli animali saranno soppressi con metodi umanitari se verranno riscontrati <i>distress</i>	

		Verrà iniettata la dose adeguata (massimo 0,2ml). Gli animali saranno sottoposti ad un accurato monitoraggio nel periodo immediatamente successivo all'iniezione.	o disagio più che lievi, in mancanza di recupero rapido, dopo l'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)	La crescita tumorale verrà misurata a giorni alterni. Il piano di monitoraggio comprenderà l'osservazione attenta della postura, della locomozione e delle dimensioni e dello stato del tumore.	L'animale verrà soppresso in caso di ulcerazione del tumore, se il tumore interferirà 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).

Analisi

Si prevede che gli animali patiranno soltanto un **LIEVE** disagio e saranno soppressi se sorgerà qualsiasi problema di salute o benessere che superi tale livello.

Risulta quindi appropriata una classificazione preventiva di gravità LIEVE.

Alla fine del presente modello è riportato un esempio di scheda di osservazione compilata.

Osservazioni cliniche

Essendo previsti pochi altri segni clinici, è stata elaborata una scheda di valutazione di base, i cui dati fondamentali sono: dimensioni del tumore, peso corporeo, postura e locomozione. È stato lasciato spazio per segni clinici inattesi da registrare come testo libero. L'annotazione "Non sono state evidenziate anomalie" conferma che gli animali sono stati controllati e che non sono state osservate deviazioni dalla norma. Di seguito viene riportato un esempio.

Risultati

- Non è stato registrato un calo ponderale significativo in nessuno degli animali.
- In 5 animali non è stato osservato nessuno sviluppo tumorale.
- In 25 animali è stata osservata la formazione di tumori sul fianco. I tumori non hanno interferito con il comportamento normale; misuravano al massimo 1 cm il giorno 14, quando gli animali sono stati sottoposti a eutanasia per l'asportazione dei tumori, conformemente a quanto previsto dal protocollo dello studio.

- In una gabbia si sono verificati alcuni comportamenti aggressivi e combattimenti; uno degli animali presentava ferite da morso sulla coda e sul dorso ed è stato separato in una gabbia individuale; le ferite sono state disinfettate localmente ogni giorno fino alla guarigione e l'animale è stato mantenuto fino al termine della procedura.

Valutazione della gravità effettiva

- 29 animali hanno completato lo studio riportando solo lievi sofferenze connesse all'iniezione e alla crescita di tumori. Per questi animali l'effettiva gravità è stata classificata di grado **LIEVE**. Uno degli animali ha riportato ferite da morso che sono state adeguatamente curate. In questo animale è stata riscontrata qualche sofferenza supplementare conseguente all'aggressione, che tuttavia era indipendente dalla procedura. I suddetti incidenti sono stati gestiti in maniera efficace e la sofferenza è stata ridotta al minimo. Sebbene il livello di sofferenza patita da questo singolo animale sia stata di grado moderato, trattandosi di un incidente indipendente dalla procedura, il livello di effettiva gravità connesso alla procedura ai fini della comunicazione è stato considerato **LIEVE**.

Esempio di scheda di osservazione (compilata per un caso ipotetico)

Crescita del tumore in topi nudi – Procedura e scheda di osservazione				
Gabbia 1 – Topi nn. 1-5				
Data	Procedura	Dimensioni tumore (cm)	Peso (g)	Osservazioni cliniche – verificare attentamente postura e locomozione
28/2	Iniezione s.c.		1- 21 2- 22 3- 21 4 -22 5- 22	Nessun segno di problemi di benessere a seguito delle iniezioni
1/3				Non sono state evidenziate anomalie
2/3	Palpazione			Non sono state evidenziate anomalie
3/3				Non sono state evidenziate anomalie
4/3	Palpazione		1- 21 2- 22 3- 21 4 -22 5- 22	Non sono state evidenziate anomalie
5/3				Non sono state evidenziate anomalie
6/3	Palpazione			Non sono state evidenziate anomalie
7/3				Qualche comportamento aggressivo; nessuna ferita

				visibile
8/3	Misurazioni del tumore	1 – 0,1 2 – 0,1 3 – 0,1 4 – nessun tumore 5 – 0,2	1- 21 2- 22 3- 21 4 -22 5- 22	Il topo 1 ha riportato ferite da morso sulla coda e sul dorso – trattamento topico; trasferito in alloggiamento singolo. La scatola per il nido è stata fornita per l'animale alloggiato singolarmente ma è stata tolta dalla gabbia con i quattro topi rimasti nell'eventualità che fosse la causa dell'aggressione
9/3				Disinfettate ferite del topo 1, in via di guarigione; nessun segno di aggressione fra gli animali rimasti
10/3	Misurazioni del tumore	1 – 0,2 2 – 0,1 3 – 0,1 4 – nessun tumore 5 – 0,2		Disinfettate ferite topo 1
11/3				Disinfettate ferite topo 1
12/3	Misurazioni del tumore	1- 0,4 2 – 0,3 3 – 0,3 4 – nessun tumore 5 – 0,5	1- 22 2- 22 3 - 21 4 -21 5- 23	Ferite topo 1 guarite, sospesa disinfezione.
13/3				Non sono state evidenziate anomalie
14/3	Eutanasia e asportazione tumore.			

1 (b) Efficacia di nuovi agenti farmacologici sulla crescita tumorale – procedura multi-fase

Lo studio mira a valutare l'efficacia di nuovi agenti nel ridurre o bloccare la crescita delle cellule tumorali. Il tumore deve essere sufficientemente sviluppato prima che possa iniziare il trattamento (di solito è sufficiente che raggiunga 0,5 cm di diametro); data la durata dello studio, alcuni tumori possono svilupparsi fino a raggiungere al massimo 1,2 cm di diametro, generalmente nel gruppo di controllo per il veicolo. I farmaci citotossici provocano spesso effetti collaterali che possono compromettere il benessere.

A 30 topi nudi maschi BALB/C saranno iniettate cellule tumorali a crescita lenta (0,1ml). Il benessere degli animali sarà valutato quotidianamente e gli animali saranno pesati una volta alla settimana per tre settimane consecutive. La crescita tumorale sarà misurata con calibri il giorno 7 e il giorno 14; il giorno 20 i tumori saranno misurati nuovamente, gli animali saranno randomizzati e inizierà il trattamento sotto forma di due iniezioni intraperitoneali al giorno per 7 giorni.

Valutazione preventiva iniziale, considerazione di perfezionamenti specifici e punti finali umanitari

Quali interventi devono essere effettuati sugli animali utilizzati in questo studio?	Che cosa proveranno gli animali? Quanta sofferenza potrebbero provocare le procedure? Che 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.

Analisi

A causa delle dimensioni del tumore, della maggiore probabilità di ulcerazione, della frequenza delle iniezioni e degli effetti avversi dei farmaci somministrati, in **questo caso si ritiene appropriata una classificazione preventiva di gravità MODERATA.**

Il grado massimo di gravità potrebbe essere LIEVE?

È alquanto improbabile, a meno che gli obiettivi scientifici possano essere raggiunti stabilendo punti finali anticipate, ad esempio riducendo le dimensioni massime dei tumori. Ciò comporterebbe inoltre l'iniezione di farmaci in dosi di cui non sono noti effetti clinici avversi significativi. A tali condizioni potrebbe essere ritenuta appropriata una classificazione della gravità **LIEVE.**

Osservazioni cliniche

Alla fine del presente modello vengono forniti un esempio di scheda di osservazione e una scheda di valutazione campione

Risultati

Dei 30 topi maschi BALB/C, 25 topi sono stati utilizzati per la valutazione dell'efficacia; a 10 animali è stato somministrato il farmaco B in dose H, a 10 animali il farmaco B in dose X e a 5 animali il farmaco C in dose Y.

Valutazione della gravità effettiva

- 3 animali non hanno sviluppato tumori e sono stati sottoposti a eutanasia in quanto inutilizzabili per l'esperimento – **LIEVE**
- 2 animali hanno sviluppato ulcerazione nel sito dell'iniezione del tumore prima dell'inizio del trattamento e sono stati sottoposti a eutanasia – **MODERATA**
- 10 animali a cui è stato somministrato il farmaco B hanno sviluppati tumori che sono rimasti di dimensioni contenute; non hanno presentato perdite ponderali significative e nessun segno clinico – **LIEVE**
- 7 animali ai quali è stato somministrato il farmaco B alla dose X hanno presentato riduzione delle dimensioni del tumore, perdita ponderale del 15% e presenza di feci molli, ma sono stati mantenuti fino al termine dell'esperimento – **MODERATA**
- 3 animali ai quali è stato somministrato il farmaco B alla dose X hanno presentato riduzione delle dimensioni del tumore, perdita ponderale del 15%, presenza di feci molli, anoressia e marcata letargia; sono stati soppressi con metodi umanitari il giorno 25 – **GRAVE**
- 5 animali ai quali è stato somministrato il farmaco C alla dose Y hanno presentato crescita continua delle dimensioni del tumore, aumento ponderale, e nessun segno clinico ad eccezione della crescita tumorale. Questi animali sono stati sottoposti a eutanasia quando le dimensioni del tumore hanno superato 1.2 cm - **MODERATA**

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				

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 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

Esempi volti a illustrare il processo di classificazione della gravità

Modello 2 – Encefalite autoimmune sperimentale (EAE) nei topi

Ultimo aggiornamento: 5 febbraio 2013

Contesto generale

L'encefalite autoimmune sperimentale (EAE) è impiegata per modellizzare vari aspetti della sclerosi multipla (SM) su roditori e primati. La SM è una patologia neurologica multiforme e complessa che si manifesta in giovani adulti. Fra i sintomi figurano infiammazione, demielinizzazione e danno assonale. I modelli animali sono utilizzati per compiere ricerche sulla fisiopatologia di questa malattia e per valutare potenziali strategie protettive o curative, fra le quali immunomodulazione, immunoprotezione, rigenerazione assonale e riparazione mielinica. Le caratteristiche di multiformità e multifasicità della SM richiedono l'utilizzo di modelli appropriati per affrontare questioni specifiche relative a diversi stadi della malattia.

L'EAE comporta la generazione di attività del sistema immunitario diretta contro la mielina, che induce infiammazione a carico del sistema nervoso centrale e apertura della barriera ematocerebrale. Ciò può provocare una grave sindrome neurologica nel modello animale, alla quale dovrebbe fare seguito una parziale guarigione durante la prima fase recidivante-remittente. Questa fase è associata a infiammazione e demielinizzazione reversibili. Dopo 9-10 settimane, l'animale entrerà nella forma progressiva, che è associata a demielinizzazione cronica e danno assonale. In questa fase è possibile valutare diverse strategie terapeutiche. Occorre stabilire attentamente i punti finali umanitari e scientifici, tenendo conto delle finalità dello studio.

Riferimenti

Emerson MR *et al.* (2009) Enhancing the ability of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis to serve as a more rigorous model of Multiple Sclerosis through refinement of the experimental design. *Comparative Medicine* **59**: 112-128

Miller SD *et al.* (2010) Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the mouse. *Current Protocols in Immunology*. **88**: 15.1.1 – 15.1.20

Weissert R (ed) (2012) *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis - Models, Disease Biology and Experimental Therapy*. Published by In Tech, DOI: 10.5772/1190, <http://www.intechopen.com>

Wolfensohn S *et al.* (in prep) Reducing suffering in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.

Studio

In questo esempio, l'EAE sarà indotta in quattro maschi e quattro femmine di topo Biozzi ABH (una varietà ampiamente utilizzata, che si ritiene dotata di un elevato valore traslazionale), al fine di valutare una potenziale terapia per la SM. In fase iniziale di pianificazione del progetto, l'utilizzatore tiene conto di tutti i possibili eventi avversi per gli animali e individua le cause potenziali di sofferenza, in collaborazione con il tecnico specializzato, il personale preposto alla cura e il veterinario incaricato. Essi individuano possibili perfezionamenti che vengono attuati nel progetto. I topi saranno stabulati socialmente a gruppi di quattro e divisi per sesso. Sarà rivolta particolare attenzione all'ambiente locale, in quanto gli animali affetti da EAE presenteranno significativi deficit motori. Le gabbie saranno provviste di pavimentazione solida, lettiera di segatura, rifugi adeguati e materiale idoneo per i nidi e blocchi da rosicchiare. Gli animali saranno trattati con adiuvante infiammatorio per indurre l'EAE e monitorati durante la convalescenza e la fase cronico-ricorrente (9-10 settimane). Una volta instauratasi la forma progressiva, saranno valutati i composti terapeutici candidati nel corso di uno studio della durata di tre settimane.

Valutazione preventiva iniziale, considerazione di perfezionamenti specifici e punti finali umanitari

Quali interventi devono essere effettuati sugli animali utilizzati in questo studio?	Che cosa proveranno gli animali? Quanta sofferenza potrebbero provocare le procedure? Che cosa potrebbe aggravare la sofferenza?	In che modo la sofferenza verrà ridotta al minimo?	
	Effetti avversi	Metodologia e interventi	Punto finale
Iniezioni multiple di adiuvante infiammatorio	Disagio o dolore dovute all'iniezione di <i>priming</i> . Possibile reazione nel sito di iniezione, che può provocare irritazione o disagio.	Verranno iniettate piccole dosi in siti sottocutanei multipli (escludendo la pianta delle zampe e la base della coda). L'adiuvante e il veicolo sono formulati in modo da ridurre al minimo l'irritazione. Gli animali saranno monitorati a seguito dell'iniezione.	Gli animali saranno soppressi con metodi umanitari se saranno osservati dolore o distress transitori di grado più che moderato dopo l'iniezione.

Induzione di EAE: sindrome neurologica severa iniziale seguita da fase di recupero	Paralisi, che può provocare distress o ansietà: coda ipotonica, debolezza degli arti posteriori, ipomobilità, paralisi degli arti, disfunzioni urinarie (incontinenza o ritenzione)	La funzione urinaria sarà monitorata tramite ispezione della vescica effettuata quotidianamente. La vescica sarà compressa manualmente quando necessario nei casi di ritenzione (monitorando attentamente eventuali segni di dolore o distress a seguito dello svuotamento della vescica) In caso di incontinenza degli animali, la gabbia sarà ispezionata di frequente verificando la presenza di lettiera e materiale per i nidi bagnati e sostituendoli in base alle necessità. Verranno forniti rifugi e materiale ideali per i nidi.	HEP per uno qualsiasi dei criteri seguenti: <ul style="list-style-type: none"> • Paralisi bilaterale arti anteriori per >24h • Paralisi bilaterale arti posteriori fino a 5 giorni • Qualsiasi automutilazione • Ritenzione urinaria persistente/Incapacità di svuotare la vescica • Paresi (perdita di movimento; paralisi lieve) • Calo ponderale del 35%* • Astensione dal mangiare e dal bere >24h dopo l'insorgenza della malattia • Non recupero dall'EAE dopo 3 settimane dall'insorgenza della malattia clinica • Segni clinici di malattia intercorrente, ad es. rannicchiamento
	Calo ponderale significativo (ad es. fino al 35%)	Verrà assicurato accesso costante all'acqua e al cibo collocati in contenitori sul fondo della gabbia. Il peso corporeo e le condizioni saranno monitorati quotidianamente e valutati più frequentemente (in base alle necessità) dopo l'inizio del calo ponderale. Saranno forniti cibi impregnati d'acqua e liquidi, con supplementazione per via sottocutanea al bisogno.	
Decorso clinico recidivante-remittente	Deficit neurologici cronici	Saranno ridotti tutti i fattori di stress, compresi i livelli di rumore. La temperatura ambiente sarà aumentata in base alle necessità, utilizzando cuscini riscaldanti e con	

		l'aggiunta di quantità supplementari di lettiera e materiali per la nidificazione.	
Somministrazione di nuovo agente terapeutico (durante la forma progressiva della malattia)	Disagio dovuto all'iniezione. Effetti collaterali o inefficacia dell'agente	Gli animali saranno monitorati assiduamente dopo l'iniezione dell'agente candidato	Gli animali saranno soppressi con metodo umanitario se verrà osservato uno qualsiasi degli indicatori summenzionati o se si verificherà qualsiasi effetto collaterale grave del nuovo agente terapeutico

* Il calo ponderale del 35% costituisce un punto finale estremo che richiede una valida giustificazione scientifica. In questo caso, un significativo calo ponderale è inevitabile; gli animali possono recuperare peso fornendo loro cure adeguate, ad es. calore supplementare e nutrimento aggiuntivo, ivi compresa l'alimentazione a mano, se necessaria. Viene fissato il punto finale del 35% per questo studio particolare come modo di limitare la necessità di indurre l'EAE in un maggior numero di animali *naive*; la quantità di animali richiesti sarebbe significativamente maggiore adottando un punto finale più "convenzionale" (ad es. del 20%).

Analisi

Si ritiene **appropriata una classificazione di gravità preventiva GRAVE** in quanto si prevede che la procedura provocherà un marcato deterioramento delle generali condizioni di benessere e salute degli animali.

La gravità potrebbe essere MODERATA?

Sebbene la gravità preventiva di questo modello dovrebbe sempre essere classificata come GRAVE per le ragioni summenzionate, la classificazione retrospettiva della gravità può risultare MODERATA, a seconda della durata dello studio e dell'applicazione di un punto finale umanitario (HEP) precoce come indicato in questa sede.

Osservazioni cliniche

Nel corso dello studio i topi sono stati monitorati da tecnici specializzati e dal personale preposto alla cura adottando un sistema di schede di valutazione clinica specificatamente studiato per il protocollo, dopo aver consultato gli utilizzatori, i tecnici specializzati, il personale preposto alla cura e il veterinario. Il sistema di valutazione comprendeva parametri relativi al peso, lo stato del mantello, il tono della coda, il controllo vescicale, il raddrizzamento, la

locomozione, paresi e segni avanzati (posizione di riposo sul fianco; paralisi quasi completa; respirazione accelerata, rallentata o profonda). Poiché il progetto comportava procedure con impatti gravi, gli animali sono stati monitorati molto assiduamente e l'utilizzatore ha condotto regolarmente revisioni continue della gravità, consultando l'organismo preposto al benessere animale, i tecnici specializzati e il veterinario incaricato. Di seguito è riportato, a scopo illustrativo, un esempio di scheda di valutazione.

Esempio di scheda di valutazione appropriata

Tabella. Scheda di valutazione clinica utilizzata per topi EAE

Data:					
Aspetto					
Peso corporeo					
Stato del mantello					
Funzioni corporee					
Controllo vescicale					
Tono coda					
Respirazione					
Ambiente					
Stato del nido					
Comportamento					
Comportamento sociale					
Locomozione					
Indicatori specifici relativi alla procedura					
Posizione di riposo sul fianco					
Tempo di raddrizzamento					
Paresi					
Paralisi					
Altre osservazioni					
(Testo libero)					

Nota: ciascun indicatore è stato valutato secondo il sistema riportato nella tabella seguente, nel quale (ad esempio) verrebbe registrato nella tabella il punteggio “1” alla voce “tono della coda” se fosse stata osservata una ridotta capacità di sollevamento della coda e il punteggio “2” alla voce “stato del nido” se il nido risultasse disorganizzato.

Tabella. Sistema di valutazione per gli indicatori riportati nella scheda di valutazione clinica EAE

Punteggio:	1 = Lieve	2 = Moderata	3 = Grave
Calo ponderale	Fino al 10%	10 - 20%	20 - 35%
Stato del mantello	Leggermente arruffato	Assenza di cura di sé (grooming)	Piloerezione marcata/prolungata
Controllo vescicale - incontinenza	Segni di parziale perdita di controllo, ad es. modiche quantità di urina nel nido	Perdita di urina più pronunciata	Incontinenza
Controllo vescicale - ritenzione	Vescica palpabile ma si svuota alla manipolazione	È necessario uno sforzo leggermente maggiore per svuotare la vescica	Incapacità di urinare senza assistenza; segni di disagio/distress durante o dopo lo svuotamento manuale
Tono della coda	Ridotto sollevamento o arrotolamento della coda	Atonia della metà distale della coda	Coda completamente atonica
Respirazione: rapida, lenta o profonda	Lieve	Moderata	Marcata
Stato del nido	Leggermente disorganizzato	Qualche tentativo di costruzione del nido, che risulta però disorganizzato	Nido assente
Comportamento sociale	Non sono previste deviazioni dalla norma in caso di sofferenza lieve; la classificazione parte da 2	Interazione ridotta con gli altri animali	Interazione ridotta in misura significativa; animale passivo
Locomozione	Impacciata	Trascinamento di un arto posteriore	Trascinamento di due arti posteriori
Posizione di riposo sul fianco	Non sono previste deviazioni dalla norma in caso di sofferenza lieve o moderata; la classificazione parte da 3	Non sono previste deviazioni dalla norma in caso di sofferenza lieve o moderata; la classificazione parte da 3	Presente
Tempo di raddrizzamento	Raddrizzamento lento quando l'animale viene collocato sul dorso	Marcata difficoltà nel raddrizzarsi	Incapacità di raddrizzarsi entro 5 secondi dopo essere stato collocato sul dorso
Paresi	Abduzione lenta degli arti anteriori quando l'animale viene collocato sul dorso	Abduzione degli arti anteriori di ampiezza ridotta quando l'animale viene collocato sul dorso	Abduzione degli arti anteriori assente

Paralisi quasi completa o completa	Non sono previste deviazioni dalla norma in caso di sofferenza lieve o moderata; la classificazione parte da 3	Non sono previste deviazioni dalla norma in caso di sofferenza lieve o moderata; la classificazione parte da 3	Presente
---	--	--	----------

Valutazione della gravità effettiva

Al termine della procedura, è stata effettuata revisione della scheda di valutazione di ciascun animale, per verificare qual era stato il punteggio raggiunto dai vari indicatori e il loro andamento nel corso del tempo.

- Due topi hanno registrato un calo ponderale dell'8% a seguito dell'induzione di EAE; presentavano mantello lievemente arruffato e abduzione lenta degli arti anteriori; hanno comunque riportato il punteggio 2 in tutti gli altri indicatori nei primi 5 giorni del progetto. Successivamente il punteggio è ritornato a 1 o 0 per ciascun indicatore per la fase recidivante-remittente e durante la sperimentazione farmacologica. Gravità = **MODERATA**
- Tre topi hanno registrato un calo compreso fra il 22 e 33% del loro peso corporeo e hanno riportato un punteggio pari a una combinazione di 3, 2 e 1 per tutta la durata della fase recidivante-remittente e nel corso della sperimentazione farmacologica. Gravità = **GRAVE**
- Un topo ha perso il 37% del suo peso corporeo nella fase post-induzione ed è stato soppresso con metodi umanitari. Gravità = **GRAVE**
- Due topi hanno registrato un calo ponderale rispettivamente del 15 e del 18% ed hanno riportato un punteggio pari a una combinazione di 2 e 3 in tutti gli altri indicatori per i primi 4 giorni dello studio. Successivamente hanno riportato un punteggio pari a una combinazione di 1 e 2 per tutta la durata della fase recidivante-remittente e durante la sperimentazione farmacologica. Gravità = **GRAVE**

Poiché non è stata riscontrata nessuna paralisi ed è risultato troppo difficoltoso valutare la respirazione a lato gabbia, entrambi questi parametri sono stati cancellati dalle schede di registrazione. Nelle sezioni per le osservazioni libere è stato annotato spesso il tempo prolungato trascorso dagli animali nel rifugio quale indicatore precoce di sofferenza e pertanto questa voce è stata aggiunta alle schede in vista di progetti futuri.

Per 6 animali la gravità è stata classificata come **GRAVE**, per 2 animali la gravità è stata classificata come **MODERATA**.

Opportunità di ulteriore applicazione del principio delle 3 R

A seguito della valutazione della effettiva gravità, gli utilizzatori hanno consultato i colleghi e la letteratura in vista di ulteriori perfezionamenti. Sono stati individuati i seguenti perfezionamenti supplementari:

- Prealimentare gli animali con alimenti integrati altamente energetici, come latte gelificato e condensato prima di somministrare l'adiuvante
- Utilizzare una dose inferiore di adiuvante
- Adottare un protocollo di studio alternativo in modo da poter ridurre la durata del progetto

I suddetti punti sono stati aggiunti al protocollo in vista di studi futuri, nell'intento di confrontare i livelli di effettiva gravità e verificare l'efficacia dei perfezionamenti.

Esempi volti a illustrare il processo di classificazione della gravità

Modello 3 – Artrite

Ultimo aggiornamento: 5 febbraio 2013

Contesto generale

I modelli animali dell'artrite sono utilizzati per studiare la patogenesi della malattia e valutare potenziali farmaci antiartritici per uso clinico. Alcuni importanti criteri di selezione dei modelli pertanto sono le somiglianze morfologiche con la patologia umana e la capacità predittiva del modello riguardo all'efficacia nell'uomo dei composti terapeutici candidati.

Fra i modelli animali di artrite reumatoide comunemente utilizzati figurano: l'artrite da adiuvanti nei ratti, l'artrite indotta da collagene di tipo II nei ratti, l'artrite da collagene di tipo II nei topi e l'artrite indotta da antigeni in numerose specie (Bendele, 2001). Di solito viene utilizzata l'iniezione alla base della coda in quanto fornisce una buona risposta immunogenica, sebbene nella letteratura vengano citati anche altri siti di iniezione. Vi sono inoltre notevoli differenze fra i ceppi per ciò che concerne la suscettibilità, la gravità e la latenza fino all'insorgenza dell'artrite. Ad esempio, la suscettibilità all'artrite di linee geneticamente modificate può essere modificata (aumentata o soppressa) a seconda degli effetti delle alterazioni geniche. In modelli animali dell'artrite che sono stati utilizzati di frequente e che sono pertanto ben validati, l'insorgenza della malattia sarà prevedibile e le tecniche di valutazione saranno probabilmente ben definite e caratterizzate. In tali modelli possono essere adottate valutazioni multiple, ivi comprese l'analisi della locomozione e l'uso di filamenti di Von Frey, anziché misure osservative singole.

Si sottolinea che dovrebbero essere effettuate revisioni periodiche dei ceppi, dei protocolli e dei perfezionamenti disponibili al fine di selezionare caso per caso quelli più idonei in relazione al quesito scientifico che ci si pone (Joe et al, 1999).

Il modello presentato in questo esempio è l'artrite indotta da collagene di tipo II nei topi, che può provocare gravi sofferenze. Il ricorso a tale modello comporta pertanto quale requisito imprescindibile una giustificazione scientifica valida. I ratti vengono immunizzati contro il collagene eterologo di tipo II, inducendo lesioni simili a quelle osservate nell'artrite reumatoide umana (Bendele, 2001). La conseguente poliartrite è caratterizzata da una marcata distruzione della cartilagine, associata a deposizione di immunocomplessi su superfici articolari, riassorbimento osseo e proliferazione periosteale, nonché sinovite e infiammazione periarticolare di grado da moderato a marcato.

Riferimenti

Bendele, A.M. Animal models of rheumatoid arthritis, *J Musculoskel Neuron Interact* 2001; 1(4):377-385

Jasemian Y et al. (2011) Refinement of the collagen induced arthritis model in rats by infrared thermography. *Br. J. Med. & Med. Res.* **1(4)**: 469-477

Joe, B., Griffiths, M.M., Remmers, E.F., Wilder, R.L. Animal models of rheumatoid arthritis, *Current Rheumatology Reports* 1999; 1 139-149

Studio

In questo esempio, l'artrite sarà indotta in 18 maschi e 18 femmine di ratto Lewis tramite iniezione ripetuta di adiuvante incompleto di Freund (FIA) e collagene. Il sito dell'iniezione sarà la base della coda. Il trattamento quotidiano inizierà dieci giorni dopo (G 10), quando l'artrite si sarà instaurata, e proseguirà poi per altri 14 giorni (fino a G 24). Obiettivo dello studio sarà testare dei potenziali agenti terapeutici. È stata effettuata a una revisione dei dati pubblicati in precedenza su composti correlati per verificare se la somministrazione di analgesici potrebbe interferire con gli obiettivi scientifici ed è stato stabilito che ciò introdurrebbe fattori sperimentali confondenti. Pertanto non verrà fornita analgesia né durante la fase di sviluppo dell'artrite né ai controlli, prestando particolare attenzione ai metodi non farmacologici di controllo del dolore (ad es. perfezionamenti della gestione) al fine di alleviare la sofferenza.

Tutti gli animali saranno sottoposti a osservazione e pesati quotidianamente, nonché valutati per mezzo di una scheda di valutazione clinica generale; saranno testati nei giorni G 0 (prima della prima iniezione), G 10 (prima dell'inizio del trattamento), G 13, G 16, G 20 e G 24. Le prove comprenderanno misurazioni indirette del deterioramento di funzioni fisiche quali il diametro delle articolazioni (misurato con compassi elettronici) e valutazioni cliniche secondo un sistema di valutazione dell'artrite. Saranno applicati punti finali umanitari sulla base dei punteggi clinici (v. sotto).

Valutazione di nuovi agenti terapeutici farmacologici in un modello di artrite del ratto (da collagene di tipo II)

Gravità GRAVE

Quali interventi devono essere effettuati sugli animali utilizzati in questo studio?	Che cosa proveranno gli animali? Quanta sofferenza potrebbero provocare le procedure? Che cosa potrebbe aggravare la sofferenza?	In che modo verrà ridotta al minimo la sofferenza	
	Effetti avversi	Metodologia e interventi	Punto finale
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	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.	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.	Se l'ulcerazione cutanea persisterà o si infetterà, gli animali saranno soppressi con metodi umanitari

Sviluppo di artrite (G0-G10)	<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).</p> <p>Per tutta la durata dello studio aggiunta di lettiera morbida e materiale morbido per i nidi.</p> <p>Per tutta la durata dello studio accesso facilitato all'acqua e al cibo (ad es. collocati sul pavimento della gabbia).</p> <p>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>
Somministrazione di agenti farmacologici (test e controllo, due volte al giorno) per via sottocutanea o intraperitoneale (dal G 10 al G 24)	<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>
Valutazione degli effetti degli agenti farmacologici sulla gravità dell'artrite (G 0, G 10, G 13, G 16, G 20 e G 24)	<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>

Nota

Prima dell'avvio di questo studio dovrebbe essere discusso e concordato un sistema di valutazione clinica e dell'artrosi da parte dei ricercatori, del chirurgo veterinario, dei tecnici specializzati e del personale preposto alla cura.

Analisi

Data la probabilità di un impatto clinico significativo sugli animali, che potrebbe protrarsi per alcune settimane, si ritiene appropriato classificare la gravità preventiva di questo studio come **GRAVE**.

La gravità potrebbe essere MODERATA?

La possibilità o meno di ridurre la gravità da grave a moderata dipende dalle finalità dello studio. Per esempio, potrebbe essere possibile classificare la gravità della procedura come MODERATA con un monitoraggio assiduo e dettagliato degli animali e qualora si sia potenzialmente in grado di applicare punti finali precoci (ad es. al momento di insorgenza della claudicazione, dopo un periodo di lieve claudicazione di un arto o utilizzando metodi diagnostici per immagini in vivo per individuare alterazioni precoci nella patologia articolare). Tali punti finali precoci (terminando lo studio il giorno 6 dopo la diagnostica per immagini) potrebbero risultare possibili nei progetti finalizzati allo studio delle alterazioni infiammatorie precoci. Anche il trattamento profilattico (con inizio prima del pieno sviluppo dell'artrite) con nuovi agenti farmaceutici aventi un forte effetto antiinfiammatorio che attenuano lo sviluppo dell'artrite può determinare una riduzione della gravità a **MODERATA**. Poiché, tuttavia, lo studio sin qui esposto mira a valutare i trattamenti per l'artrite in fase più avanzata, la classificazione della gravità resta **GRAVE**.

La gravità potrebbe superare il limite superiore previsto?

Ai sensi dell'articolo 15, paragrafo 2 della direttiva *“Gli Stati membri assicurano che una procedura non sia effettuata qualora causi dolore, sofferenza o angoscia (distress) intensi che potrebbero protrarsi e non possano essere alleviati”*. Questo studio è potenzialmente in grado di provocare sofferenza grave che si protrae per alcune settimane e pertanto dovrebbe essere considerata prolungata. Se dovesse rendersi necessario lo sviluppo di artrite grave a carico di tutti e quattro gli arti e la sofferenza degli animali non venisse alleviata, la gravità dello studio supererebbe il limite massimo di gravità e sarebbe necessario apportare perfezionamenti significativi o richiamarsi alla *“clausola di salvaguardia”* (articolo 55 della direttiva) e sottoporre alla Commissione una richiesta di autorizzazione.

In questo esempio, tuttavia, vengono adottate misure volte a ridurre la sofferenza – compatibili con l'obiettivo scientifico – fra cui: il perfezionamento della composizione, somministrazione e scelta dell'adiuvante, in modo da limitare lo sviluppo dell'artrite soltanto agli arti posteriori; la predisposizione di un ambiente confortevole e l'accesso agevolato al cibo e all'acqua; un sistema di monitoraggio particolareggiato e punti finali umanitari. La gravità del progetto pertanto non dovrebbe essere considerata superiore al limite massimo e può essere autorizzata, previa valutazione positiva del progetto che comprenda la valutazione dei danni e dei benefici.

Di seguito viene riportato un esempio di scheda di valutazione clinica per l'osservazione quotidiana dei ratti artritici

Data:	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Giorno 4
Aspetto				
Peso corporeo				
Assenza di <i>grooming</i>				
Disidratazione				
Funzioni corporee				
Dispnea				
Tachipnea				
Comportamento				
Riluttanza a muoversi				
Letargia/apatia				
Immobilità				
Vocalizzazione				
Indicatore specifico relativo alla procedura				
Punteggio zampa artritica (cfr. Tabella 2)				
Altre osservazioni				
(Testo libero)				
Punteggio totale				

Nota: ciascun indicatore è stato valutato secondo il sistema riportato nelle tabelle 1 e 2 di seguito. Ad esempio, nella scheda di valutazione verrebbe registrato il punteggio "1" alla voce "assenza di grooming" (Tabella 1), e "5" alla voce "Indicatore specifico relativo alla procedura" se i due arti posteriori riportassero rispettivamente il punteggio "3" e "2" (Tabella 2). Gli interventi e i punti finali sottoindicati tengono conto della duplice esigenza, da un lato, di evitare il più possibile sofferenze gravi e, dall'altro, di non procedere alla soppressione degli animali con metodi umanitari finché non siano stati raccolti dati sufficienti, onde evitare l'ulteriore ricorso ad animali *naive*.

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

	Punteggio
Aspetto	
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
Tacnipnea	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

HEP: viene applicato il punto finale umanitario (HEP), indipendentemente dalla presenza o assenza di altri segni clinici

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

Questo sistema di valutazione dell'artrite utilizzato come indicatore procedura-specifico si fonda su livelli crescenti di gonfiore ed eritema periarticolare.

I punteggi sono basati sull'esame obiettivo e sull'ispezione visiva e sono utilizzati per calcolare un indice dell'artrite, definito come la somma dei punteggi riportati per entrambi gli arti posteriori.

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

Nota: i punteggi totali sono tratti dalle schede di valutazione clinica, compilate secondo i sistemi di valutazione riportati nelle tabelle 1 e 2. Ad esempio, a un animale che presenta calo ponderale del 12%, segni di diminuzione del grooming e gonfiore a carico di entrambe le caviglie posteriori riporterebbe un punteggio totale pari a 5.

Valutazione retrospettiva:

36 ratti sono stati immunizzati con collagene di tipo II in adiuvante incompleto di Freund (FIA). Tutti gli animali hanno sviluppato artrite: i punteggi della zampa artritica sono stati pari a 6 entro il giorno 10. Tutti gli animali hanno presentato un calo ponderale del 5-10%. Le misurazioni del diametro articolare hanno confermato una variazione significativa rispetto ai dati di riferimento. Le osservazioni cliniche hanno rilevato l'assenza di grooming, riluttanza a muoversi, apatia, vocalizzazione alla manipolazione (durante l'osservazione e il cambio di gabbia), ridotta assunzione di cibo e periodi di immobilità.

- 12 animali sono stati utilizzati nel gruppo trattato con soluzione salina. I punteggi della zampa artritica più elevati sono stati compresi fra 6 e 8 per tutte le misurazioni (G 13, G 16, G 20 e G 24). Anche le misurazioni del diametro articolare hanno confermato aumenti significativi rispetto ai valori di riferimento in ciascuna misurazione. I punteggi clinici sono stati compresi fra 4 e 8, il calo ponderale variava fra il 5 e il 15%, ad eccezione di un unico animale il cui calo ponderale ha raggiunto il 21% il giorno 17 ed è stato soppresso con metodi umanitari.

Valutazione retrospettiva: GRAVE

- 12 animali sono stati trattati con il FARMACO A in dose **ridotta**. In tutti gli animali il punteggio della zampa artritica non è risultato diverso da quello registrato nel gruppo trattato con soluzione salina fino al G 16. Il G 20 un animale ha riportato un punteggio della zampa artritica pari a 8, mentre il punteggio degli altri è stato fra 6 e 7.

Nel G 24 cinque animali hanno riportato un punteggio della zampa artritica lievemente inferiore (5-7). I segni clinici di questi cinque animali mostravano qualche miglioramento; il peso corporeo degli animali registrava un'ulteriore calo del 5 - 10%; anche la loro mobilità in gabbia continuava a essere ridotta.

Gli altri sette animali non presentavano una diminuzione dei segni clinici e del punteggio relativo all'artrite rispetto al gruppo trattato con soluzione salina.

Valutazione retrospettiva: GRAVE

- 12 animali sono stati trattati con il FARMACO A in dose **alta**. Il G 13 i punteggi della zampa artritica erano compresi fra 4 e 6; i diametri articolari presentavano una diminuzione non significativa. Fra i segni clinici figuravano assenza di grooming e calo ponderale < 10%. Il G 16 i punteggi della zampa artritica sono scesi a 4 e i diametri articolari hanno mostrato riduzioni significative. Il G 16 il peso corporeo degli animali si era stabilizzato. In alcuni di essi si rilevava ancora riluttanza a muoversi. A partire dal G 20 il gonfiore articolare era diminuito, con punteggi compresi fra 2 e 4. I comportamenti osservati nella gabbia risultavano normali. Il peso corporeo era ritornato ai livelli pre-procedura.

Valutazione retrospettiva: GRAVE

Nota: entro la fine dello studio, nel terzo gruppo composto da dodici animali, l'agente testato 'FARMACO A' somministrato in dose **alta** si è dimostrato efficace nel ridurre l'effettiva gravità a livello moderato. Tuttavia, poiché il modello richiedeva che si raggiungesse il pieno sviluppo dell'artrite in tutti gli animali prima dell'inizio del trattamento e in tale fase della malattia tutti gli animali mostravano segni clinici compatibili con una classificazione "grave", la classificazione dell'effettiva gravità per questi animali è rimasta **grave**.

Poiché il progetto richiede il ricorso a procedure gravi, l'utilizzatore effettua regolarmente revisioni continue della gravità, in collaborazione con l'organismo preposto al benessere animale, i tecnici specializzati e il veterinario incaricato, al fine di garantire l'applicazione costante delle 3 R.

Esempi volti a illustrare il processo di classificazione della gravità

Modello 4 – Ictus cerebrale

Ultimo aggiornamento: 5 febbraio 2013

Contesto generale

L'ictus viene definito come la perdita o l'alterazione delle normali funzioni corporee risultanti da un'insufficiente apporto di sangue a una parte del cervello. Nonostante i progressi compiuti nella comprensione della fisiopatologia della lesione cerebrovascolare, un efficace trattamento dell'ictus continua a rappresentare un'importante esigenza medica tuttora insoddisfatta e proseguono le ricerche volte a individuare misure terapeutiche e di prevenzione adeguate.

Nei pazienti umani si riscontrano tre diversi tipi di ictus: ischemico, emorragico intracerebrale ed emorragico subaracnoideo. La maggior parte dei modelli animali attualmente disponibili, tuttavia, è riferita al tipo ischemico. I modelli di ictus, per loro stessa natura, rappresentano una sfida dal punto di vista del benessere animale. Al fine di garantire un equilibrio adeguato fra l'obiettivo di raggiungere un modello valido in questo ambito di ricerca e quello di ridurre al minimo la sofferenza degli animali assumono un'importanza fondamentale la comunicazione e interazione positive fra tutti i soggetti coinvolti nelle procedure scientifiche (veterinari, ricercatori, tecnici specializzati e personale preposto alla cura).

L'ictus viene abitualmente indotto nei roditori tramite occlusione temporanea o permanente dell'arteria cerebrale media (*Middle Cerebral Artery Occlusion*, modello MCAO). Il modello MCAO mira a riprodurre sperimentalmente l'ischemia cerebrale focale che si verifica nell'ictus ed è stato utilizzato ampiamente per studiare i meccanismi della lesione, individuare potenziali target e testare potenziali agenti neuroprotettivi. Sono state individuate differenze di ceppo nei topi e nei ratti, ed è stato studiato l'influsso complesso e significativo di fattori quali età, sesso e comorbidità come il diabete, l'ipertensione e l'aterosclerosi. Sebbene la ricerca preclinica sull'ictus spesso utilizzi giovani roditori maschi sani, l'impatto dei fattori summenzionati può essere esplorato utilizzando modelli con patologie comorbide (quali ad esempio ratti ipertesi spontanei, diabete indotto da streptozotocina nei ratti). In questi casi di comorbidità può risultare necessario condurre un'osservazione più attenta dei segni clinici e stabilire punti finali umanitari (HEP) più precoci.

In un disegno sperimentale standard gli animali sono addestrati a svolgere alcuni test comportamentali prima della procedura MCAO. Nella finestra temporale terapeutica, stabilita in base al meccanismo di azione farmacologica e all'obiettivo dello studio, agli animali viene somministrato il composto sperimentale. L'analisi degli esiti dovrebbe comprendere informazioni relative alle dimensioni dell'infarto, il tasso di mortalità, la frequenza di complicanze (ad es. emorragia subaracnoidea), cui si aggiunge la valutazione funzionale e neurologica per monitorare i progressi. L'imaging seriale a risonanza magnetica (MRI) si è dimostrata un potente strumento per acquisire informazioni sulla variazione delle dimensioni dell'infarto nel corso del tempo, ma può anche fornire informazioni supplementari sul flusso ematico o lo stato metabolico. Possono inoltre essere definiti punti finali di tipo istologico, biochimico e molecolare.

Ai modelli di ictus possono essere applicati vari test comportamentali. Fra i più semplici vi sono i sistemi di valutazione neurologica a punteggio (score), che valutano lo stato neurologico globale, e i test di posizionamento degli arti (*limb placing test*) utilizzati per misurare i riflessi motori. Questi test sono impiegati generalmente per valutare gli animali nella fase acuta post-ictus. In studi a lungo termine possono essere impiegati test più complessi, finalizzati a valutare le funzioni sensoriali e motorie (ad es. *bilateral sticky label*, *beam walking*, *rotarod* o *staircase*) e funzioni cognitive quali la memoria (ad es. test di evitamento passivo o di valutazione delle strategie di apprendimento).

È buona prassi effettuare un gruppo di test comportamentali, comprendenti almeno una prova per ciascuna fase (acuta e a lungo termine), in modo da raccogliere dati completi sull'impatto esercitato sulle funzioni sensoriali, motorie e cognitive. Tali test devono essere selezionati attentamente in modo da cogliere tutti gli effetti delle strategie terapeutiche da testare. In questa sede non vengono fornite descrizioni dettagliate di ciascuna di tali prove comportamentali, compresi i piani di addestramento, ma si rinvia a Schaar et al. (2010) per una esposizione e revisione esaustive sul loro utilizzo.

Riferimenti

- Braeuninger S and Kleinschnitz C. Recent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2009 Nov; 1:8.
- Freret T and Bouet V. Improvements of the Stroke Model Guidelines – Animal body weight and long-term functional concerns. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2009; 2(2): 28-31
- Graham SM et al. Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care. *Comparative Medicine*, 2004 Oct; 54(5): 486-496
- Yanamoto H et al. Evaluation of MCAo stroke models in normotensive rats: standardized neocortical infarction by the 3VO technique. *ExpNeurol*, 2003 Aug; 182(2):261-74
- Liu S et al. Rodent stroke model guidelines for preclinical stroke trials (1st edition). *Journal of experimental stroke and translational medicine*, 2009 Jan 1;2(2):2-27.
- Schaar KL et al. Functional assessments in the rodent stroke model. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2010; 2: 13; open access at <http://www.etsmjournal.com/content/2/1/13>
- Virley et al. A temporal MRI assessment of neuropathology after transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlations with Behavior. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000;20: 563-582.

Studio

Efficacia di un nuovo agente terapeutico sul modello di occlusione dell'arteria cerebrale media (MCAO) mediante monofilo intraluminale nei ratti

In questo esempio, 40 giovani ratti maschi Sprague-Dawley (300-350 g) verranno sottoposti a MCAO permanente sotto anestesia generale utilizzando la tecnica del filamento intraluminale. I ratti saranno randomizzati (n = 10/gruppo) per ricevere il veicolo (10ml/kg) o un nuovo agente sperimentale (composto A) in dosi 1, 3 o 10 mg/kg, tramite infusione endovenosa in una vena della coda per 1 ora a partire da 30 minuti dopo MCAO. Le dosi successive

(veicolo o composto A in dosi 1, 3 o 10 mg/kg) saranno somministrate per via intraperitoneale a 6 e 24 h dopo MCAO. I ratti saranno inizialmente stabulati a coppie in gabbie con pavimentazione solida, con lettiera profonda e materiale per i nidi. I topi saranno soggetti a restrizione alimentare nel periodo pre-addestramento al fine di facilitare l'esecuzione del test *staircase*, in cui l'esecuzione del compito è motivata dall'appetito. Agli animali sarà fornito cibo *ad libitum* a partire da 6 ore prima dell'intervento chirurgico fino a 6 giorni dopo MCAO per agevolare il recupero ponderale e postoperatorio.

Gli esiti funzionali saranno valutati quotidianamente utilizzando un sistema di *score* neurologico (Bederson scale; cfr. Schaar et. Al. 2010) e test comportamentali (*bilateral sticky label* e *beam walking*); anche il test *staircase* verrà somministrato quotidianamente dal giorno 7 dopo MCAO, al fine di lasciare un lasso di tempo sufficiente per il recupero post-operatorio prima di reintrodurre la restrizione alimentare. Nessuno dei test comportamentali dovrebbe provocare livelli significativi di distress. I ratti anestetizzati saranno sottoposti a risonanza magnetica (MRI) nei giorni 1,7, 14 e 28 per valutare il volume della lesione. Tutti gli animali saranno soppressi 28 giorni dopo MCAO.

Valutazione preventiva iniziale, considerazione di perfezionamenti specifici e punti finali umanitari

Quali interventi devono essere effettuati sugli animali utilizzati in questo studio?	Che cosa proveranno gli animali? Quanta sofferenza potrebbero provocare le procedure? Che cosa potrebbe aggravare la sofferenza?	In che modo verrà ridotta al minimo la sofferenza?	
	Effetti avversi	Metodologia e interventi	Punto finale
Addestramento preoperatorio a test comportamentali nell'arco di 2-3 settimane: <i>bilateral sticky label</i> (per sindrome <i>neglet</i> contralaterale), <i>beam walking</i> (per coordinamento arti posteriori) e <i>staircase</i> (per prensione zampa previo addestramento arti anteriori)	Può essere provocato un livello minimo di stress/ansia prima che gli animali si abituino alle prove, in quanto la sperimentazione richiede il trasferimento degli animali in nuovi locali/setting.	Graduale abitudine all'apparato sperimentale. Manipolazione calma ed empatica	Rimozione dell'animale dalla sessione se vengono osservati segni di distress. Gli animali che non raggiungono una prestazione base (<i>performance baseline</i>) entro i tempi prefissati saranno esclusi dallo studio.
Restrizione alimentare (85-90% del peso con alimentazione libera) in fase preoperatoria e a partire da 7 giorni dopo MCAO per facilitare la performance nel test <i>staircase</i> .	Leggera fame; possibile frustrazione e distress	Il calo ponderale non supererà il 10%, in caso contrario sarà sospesa la restrizione alimentare	Se verranno riscontrati problemi comportamentali dovuti alla mancata assunzione di cibo, gli animali saranno rimossi dallo studio.

<p>Sotto anestesia generale, occlusione transitoria della MCA utilizzando monofilo intraluminale attraverso l'arteria carotide comune.</p>	<p>Dolore e disagio associati all'intervento chirurgico</p> <p>Possibili complicanze chirurgiche impreviste, ad esempio emorragia subaracnoidea, lesione retinica isilaterale, formazione di trombo intraluminale, coinvolgimento ipotalamico di edema cerebrale con conseguente ipertermia o necrosi dei muscoli temporali. Tali complicanze possono manifestarsi in modi diversi, quali, ad esempio, collasso improvviso, paralisi, marcato <i>head tilt</i>, convulsioni.</p> <p>Reazione repulsiva e potenziali effetti dell'anestesia su variabili fisiologiche (quali ipotermia, ipotensione, ipossia).</p> <p>Apporto nutrizionale inadeguato derivante dal livello di coscienza ridotto, da ipomasticazione e motilità inadeguata, generalmente nelle prime 48 ore dopo MCAO.</p> <p>Grado di deficit deambulatorio, che potrebbe essere fonte di stress e/o frustrazione.</p>	<p>Utilizzo di anestetici appropriati e meno repulsivi possibile, associati ad analgesici idonei (efficaci pur con proprietà neuroprotettive minime).</p> <p>Chirurgo esperto in grado di utilizzare una tecnica chirurgica asettica adeguata (con valutazione regolare delle percentuali di successo).</p> <p>Mantenimento dell'omeostasi durante l'anestesia.</p> <p>Utilizzo di tecniche chirurgiche e monofili standardizzati per ridurre la variabilità e le complicanze derivanti da lesioni estese.</p> <p>Assistenza intensiva post-operatoria per i primi 3-5 giorni, ivi comprese fonti di calore esterne.</p> <p>Controlli regolari del peso corporeo; osservazione e cura delle ferite quotidiane.</p> <p>Assicurare accesso facilitato a cibo e acqua durante il periodo di recupero o somministrazione supplementare di cibo (pastone, liquido), anche assistita se necessario; reidratazione (ad es. attraverso iniezione di soluzione salina) se necessario.</p>	<p>Gli animali saranno soppressi con metodi umanitari se si verificherà uno qualsiasi dei seguenti eventi:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Problemi tecnici gravi nel corso dell'intervento chirurgico. • Impossibile recupero completo dopo l'anestesia. • Segni di complicanze chirurgiche impreviste • Calo ponderale dell'animale oltre il 20% del peso pre-chirurgico, nonostante l'alimentazione supplementare e/o la reidratazione, o se l'animale rimane immobile per oltre 24 ore.
--	--	--	--

<p>Test comportamentali (<i>bilateral sticky label e beam walking</i>) effettuati quotidianamente dal giorno 1 al giorno 28 dopo MCAO; test <i>staircase</i> effettuato quotidianamente dal giorno 7 dopo MCAO.</p>	<p>Gli animali potrebbero trovare i compiti da svolgere stressanti se le loro capacità motorie sono compromesse.</p>	<p>Monitoraggio degli indicatori comportamentali dell'ansia o del distress. Gli animali saranno sottoposti a osservazione continua da parte di personale esperto.</p>	<p>Di solito viene fissato un tempo massimo (cut-off) per l'esecuzione dei compiti richiesti e viene assegnato un punteggio finale.</p>
<p>Somministrazione di un nuovo agente terapeutico per via s.c./i.v./i.p. prima e/o dopo intervento chirurgico (a scopo profilattico/terapeutico).</p>	<p>Disagio transitorio associato alla via di somministrazione.</p> <p>Non sono previsti effetti avversi ai livelli di dosaggio somministrati.</p>	<p>Somministrazione secondo le buone pratiche, scegliendo la via e le tecniche che provocano il minore dolore e il minore distress possibili compatibilmente con gli obiettivi scientifici.</p> <p>Gli animali saranno sottoposti ad attenta osservazione per individuare eventuali effetti avversi alle sostanze testate.</p>	<p>Gli animali saranno soppressi con metodi umanitari se verranno riscontrati effetti collaterali di qualsiasi tipo dei nuovi agenti terapeutici.</p>
<p>MRI longitudinale sotto anestesia nei giorni 1, 7, 14 e 28 dopo MCAO</p>	<p>Anestesia ripetuta</p> <p>Reazione repulsiva e potenziali effetti dell'anestesia su variabili fisiologiche (quali ipotermia, ipotensione, ipossia).</p>	<p>Utilizzo di anestetici appropriati e minimamente repulsivi.</p> <p>Mantenimento dell'omeostasi durante l'anestesia, compresa somministrazione di terapia reidratante prima o durante, in caso di problemi di disidratazione e somministrazione di calore per mantenere normotermia.</p>	<p>In caso di recupero incompleto post-anestesia gli animali saranno sottoposti a eutanasia.</p> <p>Gli animali saranno soppressi con metodi umanitari se non si riuscirà a mantenere l'omeostasi dopo il recupero</p>

Analisi

La gravità del presente modello è classificata come GRAVE a causa della procedura chirurgica richiesta, degli affetti avversi (sebbene generalmente transitori) della procedura MCAO sul benessere degli animali e della possibilità di complicanze perioperatorie significative. Tuttavia l'impatto negativo sul benessere animale può essere ridotto grazie all'assistenza perioperatoria intensiva almeno per le prime 48 ore e il monitoraggio assiduo della fase

successiva, con interventi tempestivi nel caso si verificano problemi. Dal punto di vista sperimentale, l'attenzione al perfezionamento e alla standardizzazione di ogni singola procedura può contribuire a ridurre l'incidenza delle complicanze e della variabilità, migliorando così la qualità dei dati e riducendo il numero di animali utilizzati.

Risulta quindi appropriata una classificazione preventiva di gravità GRAVE

La gravità potrebbe essere MODERATA?

Sebbene la gravità preventiva di questo modello dovrebbe sempre essere classificata come GRAVE per le ragioni summenzionate, l'incidenza degli effetti severi può essere ridotta grazie all'intervento di operatori esperti, a supervisione veterinaria e cure animali esperte nonché a interventi concordati precoci nel caso insorgano complicanze. In talune circostanze potrebbe essere potenzialmente autorizzata una classificazione della gravità MODERATA, ma soltanto in base a una valutazione caso per caso, per singoli gruppi di ricercatori che abbiano maturato una comprovata esperienza con questo particolare modello e di cui sia nota la capacità di utilizzare il modello senza provocare una sofferenza più che moderata.

Osservazione clinica

Gli animali sono attentamente monitorati nel periodo post-operatorio. Vengono fornite analgesia e terapia di sostegno in base alle necessità. Alla fine di questo esempio è riportato a scopo illustrativo un sistema combinato di *score* neurologico/clinico utilizzato per monitorare le condizioni cliniche degli animali in tutte le fasi della procedura.

Risultati

Per tutti gli animali, ad eccezione del gruppo trattato con veicolo, il recupero postoperatorio è stato regolare e privo di complicanze inattese, grazie all'assistenza intensiva perioperatoria fornita.

- Tutti e 10 gli animali trattati con veicolo hanno riportato il punteggio neurologico più basso per tutta la durata dello studio, nonché prestazioni scadenti nei test comportamentali rispetto agli animali trattati. Il punteggio clinico è risultato simile a quello degli animali trattati immediatamente dopo MCAO (prime 48 h), mentre successivamente sono state osservate le seguenti differenze fra gli animali del gruppo con veicolo:
 - 1 animale su 10 ha dovuto essere sottoposto a eutanasia il secondo giorno dopo l'intervento chirurgico a causa di calo ponderale >20% (nonostante alimentazione supplementare e reidratazione)
Valutazione: GRAVE

- 6 animali su 10 hanno sviluppato deficit neurologici di grado moderato, ma hanno riportato un miglioramento minimo del punteggio clinico nel corso del tempo
Valutazione: GRAVE
 - 3 animali su 10 hanno sviluppato deficit neurologici di grado moderato e presentato una graduale riduzione del punteggio nella valutazione clinica nel corso del tempo, risultante forse dalla loro capacità di compensare e adattarsi ai deficit neurologici a lungo termine.
Valutazione: GRAVE
- Tutti e 20 gli animali trattati con il composto A in dosi più basse (1 e 3 mg/kg) hanno riportato un miglioramento dello *score* neurologico a 48 ore dal MCAO, nonché un miglioramento dello *score* clinico.
Valutazione: MODERATA
- Tutti e 10 gli animali trattati con il composto A in dose massima (10 mg/kg) hanno riportato un miglioramento dello *score* neurologico rispetto al gruppo con veicolo a partire da 24h dopo MCAO, calo ponderale minimo (5%) 24 h ore dopo l'intervento chirurgico e un significativo miglioramento dello *score* clinico a partire da 48h dopo MCAO
Valutazione: MODERATA

Valutazione della gravità effettiva

Per 7 animali la gravità è stata classificata come **GRAVE**; per 33 animali la gravità è stata classificata come **MODERATA**

Sistema di valutazione

La valutazione della gravità viene condotta attraverso una combinazione di osservazioni cliniche generali (peso corporeo, aspetto, comportamento, ambiente della gabbia) e valutazione neurologica specifica relativa alla procedura. La scala di Bederson è un sistema di valutazione neurologica globale messo a punto per misurare i deficit neurologici che insorgono a seguito di ictus. Viene utilizzata una scala da 0 a 3, in cui 0 = normalità e 3 = livello massimo di disabilità. I test previsti comprendono la flessione degli arti anteriori, la resistenza alla spinta laterale e il comportamento di maneggio (*circling*).

grado 0: nessun deficit osservabile

grado 1: flessione degli arti anteriori

grado 2: ridotta resistenza alla spinta laterale (e flessione degli arti anteriori), maneggio assente

grado 3: stesso comportamento del grado 2, maneggio presente

HEP (*humane endpoint*): punto finale umanitario

	Punteggio
Aspetto	
Calo ponderale 5-10%	1
Calo ponderale 11-15%	2
Calo ponderale 16-20%	3
Calo ponderale 20% +	HEP
Mantello lievemente arruffato	1
Piloerezione lieve	2
Piloerezione marcata	3
Comportamento	
Locomozione lievemente anormale	1
Locomozione marcatamente anormale	2
Problemi di mobilità significativi	3
Immobilità >24h	HEP
Animale teso e nervoso alla manipolazione	2
Marcato distress alla manipolazione, ad es. tremore, vocalizzazione, aggressività	3
Ambiente	
Nido leggermente disorganizzato	1
Nido appena riconoscibile	2
Nido assente	3
Punteggio neurologico	
Flessione arti anteriori	1
Diminuita resistenza alla spinta laterale (e flessione arti anteriori), maneggio assente	2
Stesso comportamento del punteggio 2, <i>circling</i> presente	3

Interventi	
Punteggio 1	Rivedere la frequenza del monitoraggio
4	Somministrare cure supplementari, <i>ad es.</i> dose extra di liquidi e pastone umido
5	Valutare l'andamento con il veterinario
12	Attuare punto finale umanitario

Interventi: si noti che, poiché le complicanze chirurgiche di solito vengono notate nella fase di recupero post-operatorio, un assiduo monitoraggio e una valutazione empatica ed esperta sono essenziali nelle prime 24 ore al fine di garantire che vengano individuati gli effetti avversi, che vengano adottati interventi idonei per affrontarli e che gli animali siano soppressi con metodi umanitari se la loro sofferenza supera il livello classificato come grave.

Esempio di scheda di valutazione individuale (Giorni 0-4)

Giorno	0	1	2	3	4
Aspetto					
Peso corporeo (g) (punteggio)	320 (0)	292 (1)	285 (2)	287 (1)	292 (1)
Stato del mantello					
Mantello arruffato/piloerezione	1	1	0	1	0
Comportamenti					
Locomozione	3	2	2	2	1
Reazione alla manipolazione	0	0	2	0	0
Ambiente					
Condizioni del nido	3	2	1	0	0
Valutazione neurologica specifica relativa alla procedura					
Punteggio totale	9	8	8	5	3
Volume della lesione (valutazione MRI)*		11%			
Altre osservazioni	Recupero post-chirurgico senza eventi degni di nota, nessuna complicanza, ha ricevuto la dose a 30 min e a 6 h	Si aggira nella gabbia e ha tentato di fare il nido	Test comportamentali, inizialmente ansioso ma li ha portati a termine tutti, nido più strutturato.	Oggi mantello meno curato, ma peso stabile e nido ben strutturato	Test comportamentali completati, meno ansioso e locomozione nettamente migliorata

* La voce “volume della lesione” (valutato utilizzando MRI) è inclusa alla fine dello studio perché venga compilata dal ricercatore. Questo dato può quindi essere correlato alle osservazioni cliniche e comportamentali per consentire l’ulteriore perfezionamento del monitoraggio, delle cure animali e delle procedure.

Esempi volti a illustrare il processo di classificazione della gravità

Modello 5 – Produzione di anticorpi policlonali nel coniglio

Ultimo aggiornamento: 5 febbraio 2013

Contesto generale

L'obiettivo primario della produzione di anticorpi negli animali da laboratorio è ottenere antisieri ad alto titolo e ad alta affinità da utilizzare a scopo sperimentale o per test diagnostici. La biologia e la biochimica moderne dipendono in larga misura dalla disponibilità di anticorpi altamente specifici da utilizzare in una vasta gamma di tecniche quali l'immunoistochimica, i saggi ELISA, l'immunoprecipitazione e l'immunoblotting. La generazione di grandi quantità di anticorpi specifici diretti contro proteine o peptidi di interesse è quindi essenziale per il successo di numerosi programmi di ricerca applicata e di base.

Nell'esempio qui proposto, verrà utilizzato un coniglio per la produzione di anticorpi diretti contro piccoli peptidi che si ritiene svolgano un ruolo importante nella regolazione della divisione cellulare, nell'ambito di un programma di ricerca che prevede studi biochimici sulla divisione cellulare nei mammiferi.

Riferimenti

- Canadian Council on Animal Care guidelines on antibody production (2002). Disponibile all'indirizzo Internet: http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Antibody_production.pdf
- EFPIA/ECVAM (Diehl K-H et al.) (2001) A good practice guide to the administration of substances and the removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* **21**: 15-23
- JWGR (2001) Refining procedures for the administration of substances. *Laboratory Animals* **35**: 1-41
- Keating SCJ, Thomas AA, Flecknell PA & Leach MC (2012) Evaluation of EMLA cream for preventing pain during tattooing of rabbits: changes in physiological, behavioural and facial expression responses. *PLOS ONE* **7(9)**: e44437 (open access, <http://www.plosone.org>)
- Leenars M, Hendriksen CFM (2005) Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendation. *ILAR Journal* **46**:269-279
- Stills HF (2005) Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR Journal* **46**:280-293
- UFAW/RSPCA (2008) *Refining Rabbit Care: A Resource for Those Working With Rabbits in Research*. Southwater, UK: RSPCA (scaricabile gratuitamente dal sito <http://www.rspca.org.uk/researchrabbits>)

Studio

In base a esperienze precedenti si è stabilito che un solo coniglio debba fornire materiale sufficiente per ciascun peptide di interesse. Il coniglio sarà alloggiato in un recinto con un gruppo stabile di conigli compatibili (anch'essi utilizzati per la produzione di anticorpi), provvisto di spazio adeguato per l'arricchimento, l'attività fisica e il normale comportamento sociale (UFAW/RSPCA 2008). L'animale sarà immunizzato con una miscela di antigene/adiuvante. A scadenze prefissate saranno prelevati modesti volumi di sangue per verificare la riuscita dell'immunizzazione. Una volta raggiunto un titolo anticorpale adeguato, l'animale sarà sottoposto a dissanguamento sotto anestesia profonda senza risveglio per la raccolta degli anticorpi nel sangue. La manipolazione dei conigli può risultare stressante e questo compito dovrebbe essere svolto soltanto da personale competente ed empatico. Il comportamento dei conigli può essere di difficile interpretazione ed è buona prassi mantenersi aggiornati sulla letteratura riguardante il comportamento e il benessere di questi animali. Ad esempio, dalla letteratura recente risulta che in talune circostanze i conigli possono mostrare espressioni facciali di dolore (Keating et al. 2012) e andrebbero esplorate caso per caso le possibilità di utilizzare tale segno quale strumento di valutazione del benessere. Data la scarsa immunogenicità del peptide a catena corta, sarà necessario somministrarlo in combinazione con un adiuvante. Mentre in passato veniva utilizzato l'adiuvante completo di Freund (FCA), attualmente sono disponibili adiuvanti sintetici che risultano efficaci anche per questa procedura e sono poco irritanti.

Valutazione preventiva iniziale, considerazione di perfezionamenti specifici e punti finali umanitari

Quali interventi devono essere effettuati sugli animali utilizzati in questo studio?	Che cosa proveranno gli animali? Quanta sofferenza potrebbero provocare le procedure? Che cosa potrebbe aggravare la sofferenza?	In che modo verrà ridotta al minimo la sofferenza?	
	Effetti avversi	Metodologia e interventi	Punto finale
Immunizzazione con antigene e adiuvante; tre iniezioni sottocutanee nei giorni 8, 22 e 37.	Disagio a seguito dell'iniezione. Possibile formazione di noduli non dolorosi come reazione all'adiuvante. Possibilità (rara) di ulcerazione nel sito dell'iniezione.	Volume, formulazione e frequenza stabiliti in conformità con le linee guida sulle buone prassi (EFPIA/ECVAM o JWGR), di solito massimo quattro siti e 0,25 ml per sito. In caso di ulcerazione, trattamento veterinario immediato.	L'animale sarà soppresso con metodi umanitari nel caso si osservi qualsiasi segno di disagio, dolore o distress prolungati (ad es. attenzione persistente ai siti dell'iniezione o a noduli), o in caso di formazione di ulcere che non guariscono.

<p>Prelievo ematico per valutare le reazioni anticorpi (ripetuto al massimo 5 volte)</p>	<p>Le operazioni di cattura, manipolazione e confinamento possono essere stressanti. Disagio lieve associato alla puntura dell'ago. Basso rischio di emorragia o formazione di ematoma.</p>	<p>Il prelievo verrà effettuato da una vena superficiale (orecchio). Verranno prelevati piccoli volumi ematici (<5ml) al solo fine di verificare i titoli anticorpali. Verrà esercitata pressione sul sito del prelievo.</p>	<p>Nel caso in cui l'animale risulti eccessivamente stressato dalla procedura, il prelievo sarà rinviato finché il comportamento sarà tornato alla normalità.</p>
<p>Dissanguamento sotto anestesia generale</p>	<p>Disagio lieve e possibile repulsione all'agente durante l'induzione dell'anestesia.</p>	<p>Utilizzo di agente anestetico minimamente repulsivo.</p>	<p>L'animale resterà sotto anestesia fino al decesso.</p>

Analisi

Il livello di gravità prevista è lieve, in considerazione dei perfezionamenti apportati alle attività di gestione e cura, della buona prassi di somministrazione e prelievo ematico e della scelta di un adiuvante con repulsività minima.

Si ritiene pertanto appropriata una gravità preventiva MODERATA.

La procedura potrebbe essere perfezionata ulteriormente?

Andrebbero riviste periodicamente le possibilità di utilizzare adiuvanti poco irritanti e agenti anestetici meno repulsivi, monitorando la letteratura e consultando i colleghi sull'argomento. Potrebbe essere adottato un programma per abituare i conigli giovani alla manipolazione al fine di ridurre ulteriormente lo stress (UFAW/RSPCA, 2008).

Osservazioni cliniche

Essendo previsti in questo studio soltanto effetti avversi di trascurabile entità, è stato utilizzato un sistema di monitoraggio di base; ad es. l'animale è stato ispezionato quotidianamente e le osservazioni sono state registrate, ma non è stato ritenuto necessario adottare una scheda di registrazione strutturata.

A scopo illustrativo alla fine del presente esempio è riportata un campione di scheda di osservazione.

Valutazione della gravità effettiva

È stata evidenziata lieve tumefazione transitoria in un sito dell'iniezione, che tuttavia non ha richiesto alcun trattamento. Il coniglio ha rivolto una certa attenzione, di breve durata, ai siti delle iniezioni, indicativa di lieve disagio. Non sono state osservate espressioni facciali di dolore.

Non sono stati evidenziati effetti avversi dovuti al prelievo ematico vero e proprio dalla vena dell'orecchio.

Per questo animale è stata ritenuta appropriata una classificazione della gravità effettiva **LIEVE**.

Esempio di scheda di osservazione

Produzione di anticorpi nel coniglio – Procedura e scheda di osservazione		
Data	Peso corporeo (kg)	Osservazioni
1/3	3,5	Prelievo di sangue: 5ml dalla vena dell'orecchio; non sono stati osservati effetti avversi
2/3		Non sono state evidenziate anomalie
6/3		Non sono state evidenziate anomalie
7/3		Non sono state evidenziate anomalie
8/3	3,6	Immunizzato: 0,25ml x 2 siti s/c, dimostra una certa attenzione per i siti (<i>grooming</i>) per parecchi minuti, poi torna alla normalità
9/3		Non sono state evidenziate anomalie
10/3		Non sono state evidenziate anomalie
11/3		Non sono state evidenziate anomalie
12/3		Lieve tumefazione, morbida e non dolorosa nel sito al lato sinistro.
13/3		Persiste tumefazione al lato sinistro, non peggiorata
14/3		La tumefazione al lato sinistro è ancora presente, ma non dolorosa alla palpazione
15/3	3,6	Tumefazione scomparsa, tutto nella norma
21/3		Non sono state evidenziate anomalie
22/3	3,6	Immunizzato – 0,25ml x 2 siti s/c, attenzione per breve tempo ai siti

28/3		Non sono state evidenziate anomalie
29/3	3,7	Non sono state evidenziate anomalie
30/3		Prelievo di sangue: 2ml dalla vena dell'orecchio; non sono stati osservati effetti avversi

5/4		Non sono state evidenziate anomalie
6/4	3,6	Immunizzato: 0,25ml x 2 siti

14/4	3,6	Non sono state evidenziate anomalie
15/4		Prelievo di sangue: 2ml dalla vena dell'orecchio, non sono stati osservati effetti avversi

26/4		Non sono state evidenziate anomalie
27/4	3,6	Dissanguamento sotto anestesia generale, non sono stati osservati effetti avversi

Occorre annotare la conferma che l'animale è stato ispezionato almeno una volta al giorno: sulla scheda individuale dell'animale (v. sopra) oppure sulla scheda di registrazione collettiva (room record).

Esempi volti a illustrare il processo di classificazione della gravità

Modello 6 – Produzione e mantenimento di animali geneticamente modificati (GM)

Ultimo aggiornamento: 5 febbraio 2013

1. Contesto generale

L'utilizzo di animali geneticamente modificati (GM) nella ricerca ha contribuito alla conoscenza della funzione dei geni e delle proteine ad essi corrispondenti. Fenotipi diversi possono avere molteplici effetti sul benessere degli animali e taluni possono provocare dolore, sofferenza o distress. Sebbene alcuni esiti e fenotipi siano prevedibili, nel corso della creazione di linee GM possono manifestarsi numerose caratteristiche inattese o secondarie e pertanto non è sempre possibile prevedere in modo accurato la gravità. In pratica, in molte linee GM il fenotipo non viene influenzato e possono essere introdotti protocolli di valutazione per garantire l'individuazione di qualsiasi fenotipo avverso. In altri casi il fenotipo atteso può essere spesso associato a fenotipi secondari imprevisti che si manifestano in fasi temporali diverse e che possono essere influenzati da fattori ambientali diversi.

Nel valutare il danno effettivo patito dall'animale, occorre tenere in considerazione molteplici fattori, fra i quali il tipo di mutazione, il genotipo, il fenotipo e strategia di riproduzione (ad es. evitare fenotipi omozigoti dannosi accoppiando eterozigoti x ceppo di riferimento), nonché le caratteristiche di qualsiasi ulteriore procedura scientifica o di gestione e i potenziali effetti di tutti questi elementi. Ai fini della efficace valutazione dello stato di benessere degli animali occorrono osservazioni sistematiche ed effettuate nei tempi opportuni, sia durante la progressione della colonia che per tutto il corso della fase sperimentale della colonia stessa.

Le nuove linee dovrebbero essere attentamente monitorate e sottoposte a una valutazione standard del benessere. Tutte le linee dovrebbero essere valutate individualmente da personale competente e adeguatamente formato durante la progressione e il mantenimento della colonia; dovrebbero inoltre essere raccolte e comunicate le informazioni relative a specifici effetti avversi osservati. Il personale autorizzato dovrebbe applicare tutte le procedure scientifiche previste e, in collaborazione con il personale preposto alla cura, dovrebbe monitorare e registrare tutti gli effetti prodotti sugli animali. Dovrebbero essere fissati preventivamente punti finali umanitari riferiti a parametri quali il calo ponderale, le condizioni fisiche e comportamenti ritenuti importanti, nonché specifiche caratteristiche evolutive. Nessun animale dovrebbe essere mantenuto in vita qualora vengano superati i limiti di gravità previsti, a meno che non vi siano ragioni scientifiche valide e soltanto previa autorizzazione rilasciata dall'autorità competente.

Il tipo, la frequenza e la durata delle osservazioni dipenderanno da una serie di fattori diversi rispetto alla mutazione introdotta. Ad esempio, il background genetico e le condizioni ambientali nelle quali vengono mantenuti gli animali possono modificare in maniera significativa l'espressione del fenotipo. Questi fattori specifici dovrebbero essere annotati accuratamente, per agevolare raffronti più precisi fra le strutture e in generale agevolare il monitoraggio degli animali GM. Occorre tenere conto anche del ciclo di vita di ciascuna linea all'interno di una determinata struttura, in quanto alcuni fenotipi si manifestano a distanza di tempo e potranno essere osservati solo se gli animali saranno mantenuti per periodi prolungati.

Riferimenti

RSPCA GA Passport Working Group (2010) *GA Passports: The Key to Consistent Animal Care*. Southwater, UK: RSPCA (disponibile all'indirizzo Internet: <http://www.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals/implementing3rs/gapassport>)

Wells DJ et al (2006) *Assessing the welfare of genetically altered mice Laboratory Animals* **40(2)**: 111-114 (disponibile all'indirizzo Internet: <http://www.nc3rs.org.uk/downloaddoc.asp?id=356&page=231&skin=0>)

2 Esempi

I tre esempi riportati di seguito ai paragrafi 2.1, 2.2 e 2.3 illustrano come si possa valutare la gravità nei topi geneticamente modificati, prendendo in esame fra l'altro le tappe evolutive fondamentali (*milestones*), l'impatto delle procedure e lo sviluppo delle colonie. Ciascun esempio verte in particolare sui principi di valutazione della gravità, più che soffermarsi su ogni possibile scenario nell'intero corso dello sviluppo della colonia.

La creazione di ciascun modello seguirà procedure standardizzate che richiedono la preparazione chirurgica di maschi da monta vasectomizzati, la manipolazione di embrioni e il relativo impianto chirurgico in femmine pseudo-gravide. Si presuppone l'adozione di buone pratiche riguardo all'asepsi, la gestione del dolore e la competenza del chirurgo.

La conferma della presenza di progenie derivata dalla linea del fondatore o germinale sarà documentata in base ai campioni di tessuti ottenuti quale effetto secondario di operazioni di identificazione (intaglio nell'orecchio) o mediante il metodo meno invasivo in grado di fornire una quantità di tessuto sufficiente per la valutazione del genotipo. La strategia di fenotipizzazione per ciascuna linea dipenderà dal gene, dall'ambito di ricerca e dagli effetti previsti. La valutazione della gravità sarà stabilita mediante una serie di osservazioni standardizzate.

2.1 Modello di topo geneticamente modificato – *GeneA*^{tm1a(Funding)Lab}

2.1.1 Contesto generale

È stata creata una colonia di topi con una nuova mutazione nel *GeneA* mirata a una linea cellulare staminale embrionale derivata dal background C57BL/6N con un potenziale fenotipico sconosciuto. Il modello è stato mantenuto in un background definito (C57BL/6N). Una volta stabilita la trasmissione della linea germinale dei topi G1, è stato condotto uno screening di valutazione del benessere di base utilizzando 30 piccoli provenienti da 3-5 nidiate ottenute da accoppiamenti indipendenti. La progenie è stata monitorata al raggiungimento di determinate tappe evolutive fondamentali (*milestones*) prefissate nello sviluppo della colonia: alla nascita, 14 giorni dopo la nascita (in concomitanza con l'identificazione dei piccoli e il prelievo di tessuto per la genotipizzazione) e allo svezzamento. È stata predisposta una idonea scheda di punteggio sulla base del GA Welfare Assessment Scheme (Wells et al. 2006). Le osservazioni condotte sui piccoli sono state effettuate da tecnici specializzati a lato gabbia, mentre i gestori della colonia hanno monitorato i rapporti genotipici. Laddove

possibile i topi sono stati alloggiati in gruppi dopo lo svezzamento, in gabbie ventilate individualmente contenenti lettiera, materiale per la nidificazione e per l'arricchimento ambientale secondo le necessità. I tecnici specializzati hanno effettuato le valutazioni a lato gabbia durante le loro interazioni quotidiane finché i topi hanno raggiunto la maturità sessuale. Le valutazioni a più lungo termine degli effetti avversi sul benessere correlati all'età sono state monitorate e registrate a partire dagli animali di riserva e destinati alla riproduzione futura. Tutte le osservazioni sono state confrontate con quelle relative al ceppo di *background* e ne è stata valutata la rilevanza.

2.1.2 Valutazione preventiva

Quali interventi devono essere effettuati sugli animali utilizzati in questo studio?	Che cosa proveranno gli animali? Quanta sofferenza potrebbero provocare le procedure? Che cosa potrebbe aggravare la sofferenza?	In che modo verrà ridotta al minimo la sofferenza?	
	Effetti avversi	Metodologia e interventi	Punto finale
Effetti di baseline della modificazione genetica	<p>La modificazione genetica può determinare effetti clinici avversi.</p> <p>Nei casi in cui tali effetti sono imprevedibili, qualsiasi indicazione che gli animali portatori della mutazione presentino deviazioni dai parametri fisici o comportamentali (ad es. deviazioni che si verificano notoriamente in fenotipi correlati al background genetico e/o controlli del ceppo di riferimento (<i>wild type</i>)) potrebbe denotare un problema di benessere.</p>	<p>Monitoraggio costante a lato gabbia</p> <p>Valutazione del benessere al raggiungimento di tappe evolutive predefinite: nascita, svezzamento e maturità sessuale.</p> <p>A seconda del tipo di effetto avverso individuato, verranno applicati adeguati fattori di miglioramento laddove possibile: ad es. modifiche alle strategie di riproduzione o perfezionamenti nella gestione (ad es. aumento del materiale per la nidificazione per compensare la ridotta capacità di termoregolazione)</p>	<p>Gli animali saranno soppressi se sarà superato il livello di gravità moderato</p>
Prelievo di tessuti per genotipizzazione	<p>Dolore e/o distress potenziali provocati dalla metodologia di prelievo dei tessuti, ad es. perforatura/intaglio auricolare o taglio a punta della coda (<i>tail 'tipping'</i>)</p>	<p>Laddove i singoli animali vengano identificati utilizzando un intaglio nell'orecchio, è buona prassi, se possibile, utilizzare il tessuto prelevato</p>	<p>Non applicabile, in quanto la procedura dovrebbe essere eseguita una tantum ed è improbabile che vengano provocati dolore e distress di</p>

	<p>La biopsia della coda è utilizzata di solito quando sono necessarie quantità maggiori di DNA, ma può provocare dolore sia a breve che a lungo termine (in quest'ultimo caso per formazione di neuroma).</p>	<p>per la genotipizzazione.</p> <p>Nel taglio a punta della coda, va rimossa una porzione minima della coda (tenendo presente che è altamente indesiderabile ripetere il prelievo); gli animali vanno sottoposti ad anestesia e analgesia secondo le necessità e occorre intervenire tempestivamente in caso di eccessivo sanguinamento.</p> <p>Dovrebbero essere monitorati i progressi compiuti nelle tecniche meno invasive, valutati a livello locale e attuati ogni qualvolta risulti fattibile.</p>	<p>intensità tale da rendere necessaria la soppressione con metodi umanitari.</p>
Fenotipizzazione	<p>Forme di stress indotte dalla manipolazione o dall'applicazione del saggio fenotipico: ad esempio lo stress dovuto a operazioni quali il trasferimento in un ambiente non familiare, la somministrazione di composti sperimentali per indurre una reazione, il monitoraggio delle infezioni, l'anestesia e il confinamento dell'animale per sottoporlo a tecniche di imaging, eccetera.</p>	<p>Formazione del personale preposto alla fenotipizzazione su modalità di manipolazione o osservazione competenti, empatiche e standardizzate.</p> <p>Utilizzo dell'anestesia durante l'esecuzione di tecniche di imaging o di procedure dolorose. Strutturazione dei test fenotipici in modo da partire da quelli meno invasivi (ad es. osservazione del comportamento in setting aperto) fino a quelli più invasivi (ad es. procedure che richiedono anestesia).</p>	<p>Nei casi in cui la mutazione dovesse suscitare una reazione severa a un saggio fenotipico, saranno raggiunti i punti finali umanitari e gli animali saranno soppressi con metodi umanitari.</p>

Il gene oggetto di indagine è un nuovo mutante con effetti avversi sconosciuti. Le esperienze compiute in questo stabilimento hanno dimostrato che la grande maggioranza di modelli simili mostra in genere un fenotipo di gravità lieve. Occasionalmente, tuttavia, un modello può manifestare inaspettatamente segni clinici di gravità moderata e pertanto, su tale base, questo esempio verrebbe classificato preventivamente di gravità MODERATA.

2.1.3 Risultati

Valutazione iniziale negli animali neonati (alla nascita):

Colore dei piccoli (solo per i neonati)	Normale
Attività dei piccoli (solo per i neonati)	Normale
Strofulo (<i>milk spot</i>) (solo per i neonati)	Presente
Nidiata	Tutti i piccoli sono risultati conformi ai parametri di background quanto a dimensioni della nidiata, omogeneità della nidiata, sviluppo e crescita dei piccoli.

Sono stati osservati i seguenti indicatori 14 giorni dopo la nascita e lo svezzamento:

Aspetto generale	Tutti i piccoli morfologicamente 'normali' Non evidenziati segni di malformazione
Dimensioni, conformazione e crescita	Crescita normale, secondo la curva di crescita standard per il ceppo di background
Stato del mantello	Normale
Comportamento: postura, deambulazione, attività e interazioni con l'ambiente	Comportamenti e interazioni normali fra tutti i componenti della stessa gabbia; non segni di iperattività o aggressione.
Segni clinici	Non evidenziati
Taglia relativa	Nella norma in relazione al background
Numero	Mortalità pre-svezzamento nella norma in relazione al background

Osservazioni cliniche

Tutte le osservazioni e i rapporti rilevati sui piccoli dalla nascita fino allo svezzamento sono risultati nella norma in relazione al background genetico; (C57BL/6N) topi omozigoti, eterozigoti e *wild type* nati con rapporti mendeliani normali.

All'età di 4 settimane, alcuni topi di controllo omozigoti e *wild type* (7+7) sono stati sottoposti a una serie di test osservativi e procedurali di grado lieve, fra i quali protocolli SHIRPA, test per dismorfologia, test Open Field, esami del sangue e tecniche radiografiche DEXA e Faxitron per un periodo di 16 settimane. Alla conclusione di questo esperimento, l'analisi fenotipica ha evidenziato una riduzione della clearance del glucosio nei topi omozigoti a seguito di un test intraperitoneale di tolleranza al glucosio (ipGTT). Sebbene la clearance del glucosio risultasse ridotta durante la prova, dopo la procedura tutti gli animali sono ritornati al proprio stato basale e non sono stati evidenziati effetti avversi.

2.1.4 Analisi dei risultati

Valutazione della gravità effettiva

Dopo la creazione della colonia, per il mantenimento e la progressione della colonia sono stati utilizzati topi eterozigoti e componenti *wild type* di una stessa nidata. Non sono stati evidenziati fenotipi dannosi in nessuno dei topi utilizzati per la riproduzione e il mantenimento e pertanto si è ritenuto che essi non abbiano presentato effetti avversi. Poiché non sono previsti fenotipi dannosi, questa linea ha potuto essere resa omozigote e mantenuta senza richiesta di autorizzazione per il progetto.

L'accoppiamento summenzionato di topi eterozigoti x eterozigoti ha prodotto topi omozigoti. Un gruppo di tali topi è stato utilizzato per uno screening fenotipico standard che consisteva in una serie di protocolli di gravità lieve, comprendenti l'inserimento di un ago per il prelievo ematico nel test i.p. di tolleranza al glucosio. I controlli *wild type* sono stati sottoposti ai test contemporaneamente. L'effetto cumulativo sui topi sarebbe risultato di grado lieve, a causa del prelievo ematico e le successive procedure di fenotipizzazione, a differenza dell'effetto complessivo dell'alterazione genetica.

Sintesi

Riproduzione e mantenimento: non sono stati evidenziati effetti avversi

Topi omozigoti + controlli: gravità LIEVE, a causa dei test di screening (non per effetto della modificazione genetica)

In sintesi, si può ritenere che questa linea di topi geneticamente modificati abbia un fenotipo non dannoso. La riproduzione di linee stabilite non richiederebbe il rilascio dell'autorizzazione per il progetto ai sensi della direttiva.

2.2 Modello di topo geneticamente modificato – *Tg(GeneB)^{Labcode}*

2.2.1 Contesto generale

Come modello per lo studio di un tipo di cancro sarà creata una colonia di topi con una mutazione che sovraesprime un transgene. La linea sarà creata in un background C57BL/6N. L'insorgenza e il tasso di sviluppo tumorale, tuttavia, non possono essere definiti e richiederanno una valutazione nell'ambito della caratterizzazione del modello. Una volta stabilite le linee fondatrici, sarà condotto uno screening di valutazione del benessere di base, secondo la descrizione riportata al punto 2.1. La linea più utile sarà fatta progredire per studiare il tipo di leucemia oggetto di indagine.

2.2.2 Valutazione preventiva

Quali interventi devono essere effettuati sugli animali utilizzati in questo studio?	Che cosa proveranno gli animali? Quanta sofferenza potrebbero provocare le procedure? Che cosa potrebbe aggravare la sofferenza?		In che modo verrà ridotta al minimo la sofferenza?	
	Effetti avversi	Metodologia e interventi	Punto finale	
Valutazione e caratterizzazione dello sviluppo tumorale	<p>Il calo ponderale e lo scadimento delle condizioni fisiche progrediranno con lo sviluppo del tumore.</p> <p>Edemi sottocutanei possono provocare disagio e alterare il comportamento, la postura o la locomozione normali.</p> <p>Gli animali possono essere più soggetti a malattie a causa del sistema immunitario compromesso.</p>	<p>Gli interventi saranno basati su osservazioni quotidiane, adottando criteri quali calo ponderale, scadimento delle condizioni fisiche, letargia, eccetera.</p> <p>Attività quotidiane di osservazione e monitoraggio delle condizioni generali e della crescita tumorale.</p>	<p>Saranno soppressi con metodi umanitari gli animali destinati a mantenimento e riproduzione che presentino segni clinici non compatibili con le procedure sperimentali, quali calo ponderale oltre il 15%, stato scadente del mantello e letargia.</p> <p>Gli animali saranno soppressi con metodi umanitari in caso di ulcerazione del tumore, se il tumore interferisce con il comportamento, la postura o la locomozione normali o se supera le dimensioni di 1,2 cm di diametro.</p> <p>Gli animali che presentano segni di malattia intercorrente saranno soppressi con metodi umanitari.</p>	

Il modello preso in esame subirà una mutazione al fine di creare la malattia genetica prevista. Sebbene l'insorgenza della malattia non possa essere prevista facilmente, i segni clinici possono essere predefiniti al fine di caratterizzarne l'insorgenza. Una volta caratterizzato, il modello dovrebbe essere mantenuto al fine di consentirne l'utilizzo nel corso di successivi studi sperimentali sulle potenziali terapie per il tipo di cancro che è oggetto di studio. Su tale base, la gravità del presente esempio verrebbe classificata in via preventiva come MODERATA.

2.2.3 Risultati

Le valutazioni del benessere sono state condotte secondo le modalità riportate al punto 2.2. Non sono state evidenziate anomalie nelle tappe evolutive fondamentali, nel corso della crescita fino alla maturità sessuale. La colonia è stata ingrandita con animali di mantenimento e destinati alla futura riproduzione fatti accoppiare a partire da 10 settimane di età per il mantenimento della colonia e per la produzione di nuovi animali da utilizzare a fini sperimentali. Gli animali sono stati monitorati costantemente per tutto il periodo e lo sviluppo tumorale è stato evidenziato a partire da 18 settimane di età nel 60% degli animali portatori della mutazione. Il decorso clinico della malattia è stato di 4-6 settimane, termine entro il quale è stato necessario sottoporre gli animali a eutanasia.

2.2.4 Analisi dei risultati

Valutazione della gravità effettiva

Lo sviluppo tumorale è stato osservato nel 60% degli animali portatori della mutazione a partire da 18 settimane di età. La strategia riproduttiva prevedeva l'accoppiamento degli animali a partire da 10 settimane di età. Si è ritenuto che le probabilità che le coppie destinate alla riproduzione sviluppassero tumori fossero sufficienti da alterare la riproduzione e il mantenimento. Le coppie sono state fatte accoppiare a partire da 6 settimane di età; gli abbinamenti sono stati interrotti entro le 12 settimane di età e i maschi da monta sono stati soppressi. Le femmine da mantenimento e riproduzione sono state monitorate quotidianamente per individuare i segni precoci di sviluppo tumorale. Gli animali non utilizzati o non richiesti sono stati soppressi con metodi umanitari prima dell'insorgenza di qualsiasi segno clinico.

Sintesi

Animali di età inferiore a 18 settimane: non sono stati evidenziati effetti avversi

Animali a partire da 18 settimane di età che hanno sviluppato tumori: gravità LIEVE dati i punti finali clinici precoci

Animali a partire da 18 settimane di età che hanno sviluppato tumori e destinati all'uso: gravità LIEVE o MODERATA a seconda dei punti finali applicati

2.3 Modello di topo geneticamente modificato – *GeneC*^{tm1a(Financing)Lab}

2.3.1 Contesto generale

È stata creata una colonia di topi con una mutazione nel *GeneC* mirata a una linea cellulare staminale embrionale derivata dal background C57BL/6N con un potenziale fenotipico noto per testare il comportamento e la memoria. Il modello è stato mantenuto in un background definito (C57BL/6N). Una volta stabilita la trasmissione della linea germinale dei topi G1 è stato condotto uno screening del benessere di base.

2.3.2 Valutazione preventiva

Come al punto 2.1, il gene oggetto di indagine è un nuovo mutante. L'intento è utilizzare il modello in studi comportamentali futuri volti a testare l'efficacia di nuovi composti farmaceutici. Le esperienze compiute presso questo stabilimento hanno dimostrato che la grande maggioranza dei modelli simili presenta in genere un fenotipo di gravità lieve. Occasionalmente, tuttavia, un modello può presentare inaspettatamente segni clinici di gravità moderata e pertanto, su tale base, la gravità del presente esempio verrebbe classificata preventivamente come MODERATA.

2.3.3 Risultati

Tutte le osservazioni e i rapporti sono stati considerati normali in relazione al background genetico (C57BL/6N) di questo modello; topi omozigoti, eterozigoti e *wild type* nati con rapporti mendeliani normali.

A 4 settimane di età, i topi di controllo omozigoti e *wild type* sono stati sottoposti a una serie di osservazioni e test per valutare l'apprendimento e la memoria. Tali test sono stati condotti per un periodo di 10 settimane. Alla conclusione di questa analisi fenotipica non sono stati evidenziati fenotipi dannosi. Il modello è quindi stato utilizzato per testare l'efficacia di nuovi composti farmaceutici.

La riproduzione dei topi eterozigoti ha prodotto animali omozigoti sani, che hanno mostrato una performance riproduttiva simile al ceppo di background. Per ridurre il numero di animali è stata adottata una strategia di riproduzione di accoppiamenti omozigoti. A differenza all'accoppiamento originario, in cui i topi omozigoti erano derivati da un accoppiamento eterozigote x eterozigote, il nuovo gruppo di animali omozigoti derivato da un accoppiamento genitoriale omozigote appariva di dimensioni ridotte e non riusciva a raggiungere pienamente la taglia e il peso dei fratelli.

Sebbene la linea fosse originariamente destinata ad essere utilizzata come modello per studi comportamentali e sulla memoria, è stata condotta un'ulteriore analisi sui campioni di tessuti e di sangue prelevati da questi animali. Esaminando i risultati emersi dalle analisi del sangue e dalla successiva revisione della letteratura, si è riscontrato che il *GeneC* è una proteina di trasporto essenziale che si lega alla vitamina B12. La delezione del *GeneC* ha dato luogo a una rottura nel meccanismo di trasporto extracellulare che ha determinato danni a livello della sintesi del DNA e del metabolismo lipidico e proteico. L'effetto di questa mutazione non sarebbe stata evidenziata in topi nati da una femmina eterozigote in quanto la fonte materna di vitamina B12

viene trasferita al feto in via di sviluppo in utero attraverso la placenta. I topi knockout originari per questo gene, pertanto, avevano immagazzinato una quantità sufficiente di vitamina B12 da poter sopravvivere e prosperare almeno fino a 16 settimane di vita, con fertilità e riproduzione normali rispetto al ceppo di background.

2.3.4 Analisi dei risultati

Valutazione della gravità effettiva

Questo esempio dimostra come il mantenimento di una colonia possa avere un impatto rilevante e spesso inatteso sui topi. In base alle informazioni e ai risultati precedentemente disponibili riferiti alla fenotipizzazione e riproduzione primaria, questa sarebbe apparsa come una colonia ordinaria. Logicamente, il mantenimento di una colonia in una strategia di accoppiamento fra omozigoti garantirebbe di norma la produzione del numero minimo di animali e ciò è desiderabile al fine di limitare il più possibile l'utilizzo degli animali. In linee precedentemente mantenute come animali normali, senza autorizzazione per il progetto, possono verificarsi fenotipi dannosi imprevedibili. A causa degli effetti avversi sul benessere degli animali citati in questo esempio, il modello in questione dovrebbe rientrare nell'ambito dei progetti soggetti ad autorizzazione se venisse applicato questo tipo di piano riproduttivo.

Sintesi

Riproduzione e mantenimento di accoppiamenti eterozigoti: non sono stati evidenziati effetti avversi

Riproduzione e mantenimento di accoppiamenti omozigoti: gravità MODERATA per la progenie di questa generazione, a causa delle dimensioni inferiori alla norma e della crescita inadeguata degli esemplari

Esempio 2.3: quanto sin qui esposto evidenzia la necessità, nei casi in cui potrebbero manifestarsi fenotipi dannosi, di un accurato e utile trasferimento fra istituti dei dati relativi al benessere, ad esempio sotto forma di “passaporto del topo”.

