



UNIVERSITÀ DI PISA
ORGANISMO PREPOSTO AL BENESSERE ANIMALE

Attività seminariale a distanza
Protezione degli animali utilizzati a fini scientifici

13 novembre 2020

Suggerimenti per la stesura di protocolli di ricerca *in vivo*

Antonello Di Paolo

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale
Università di Pisa

D.Lgs 26/2014

Art. 1.

Oggetto e ambito di applicazione

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

a) la sostituzione, la riduzione dell'uso di animali nelle procedure e il perfezionamento delle tecniche di allevamento, di alloggiamento, di cura e di impiego degli animali nelle procedure;

b) la provenienza, l'allevamento, l'identificazione, la cura, l'alloggiamento e la soppressione degli animali;

c) le attività degli allevatori, dei fornitori e degli utilizzatori;

d) la valutazione e l'autorizzazione dei progetti che prevedono l'uso degli animali nelle procedure.

3R



OPBA

MINSAL

ISS



D.Lgs 26/2014

Articolo 31

Art. 31.

Autorizzazione dei progetti

2. L'organismo di cui all'articolo 25 inoltra, per via telematica certificata, al Ministero apposita domanda di autorizzazione, allegando:

- a) la proposta del progetto;
- b) la sintesi non tecnica del progetto di cui all'articolo 34;
- c) il modulo di cui all'allegato VI del presente decreto.

D.Lgs 26/2014

Articolo 31

Art. 31.

Autorizzazione dei progetti

4. La valutazione tecnico-scientifica tiene conto:

Ricerca preclinica



D.Lgs 26/2014

Allegato VI

14-3-2014

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

Serie generale - n. 61

ALLEGATO VI

Schema per la presentazione di un progetto di ricerca ai sensi dell'articolo 31

1. Utilizzatore (persona fisica o giuridica ai sensi della lett. f) dell'articolo 3)
2. Titolo del progetto di ricerca
3. Parole chiave (massimo 5 parole)
4. Responsabile del progetto di ricerca (ai sensi della lett. g) dell'articolo 3)

Dipartimento o Struttura di afferenza

Indirizzo

Recapiti telefono:

e-mail:

D.Lgs 26/2014

Allegato VI

14-3-2014

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

Serie generale - n. 61

9. Elenco e Competenza del personale che partecipa al progetto di ricerca

Nominativo	Titolo di Studio o Qualifica	Ruolo nello staff	Formazione

Ricercatore supervisore degli esperimenti di immunoistochimica

Ricercatore responsabile del progetto e dell'esecuzione degli esperimenti, esecutore della chirurgia.

D.Lgs 26/2014

Allegato VI

14-3-2014

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

Serie generale - n. 61

9. Elenco e Competenza del personale che partecipa al progetto di ricerca

Nominativo	Titolo di Studio o Qualifica	Ruolo nello staff	Formazione

Corso di formazione
"Attuazione della Direttiva
CEE n.609/86 in materia di
protezione degli animali
utilizzati ai fini
sperimentali o ad altri fini
scientifici"

Corso OPBA su aspetti
normativi e procedure
operative (25/09/2014)

Formazione: indicare la frequentazione di corsi di aggiornamento

D.Lgs 26/2014

Allegato VI

14-3-2014

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

Serie generale - n. 61

10. Si prevede di utilizzare il seguente numero complessivo di animali (*specificare se animali geneticamente modificati*)

Specie animale: *Mus musculus* wild type, [redacted] n. 104

Specie animale: *Mus musculus* geneticamente modificati, fenotipo non sofferente

[redacted] n. 55

11. Specificare se Animali Geneticamente modificati ed eventuali / numeri parziali riferiti a diverse specie e/o ceppi animali

Specie	Ceppo	Numero/ anno
Mus musculus	[redacted]	35/anno1 e 2; 34/anno3
Mus musculus	[redacted], geneticamente modificato	19/anno1; 18/anno 2 e 3

D.Lgs 26/2014

Allegato VI

14-3-2014

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

Serie generale - n. 61

16. Obiettivi del progetto di ricerca

Obiettivo primario



Endpoint primario



- Numerosità del campione da arruolare
- Verifica dell'ipotesi iniziale

Obiettivi secondari

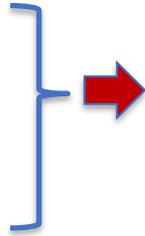


Endpoint secondari

Obiettivi ed endpoints

Obiettivo primario

Attività antiipertensiva del farmaco H in un modello murino di ipertensione indotta e spontanea



Endpoint primario

Misurazione della pressione arteriosa (target: riduzione di X mmHg rispetto al controllo/basale)

Obiettivi secondari

- Farmacocinetica di H nei modelli murini
- Effetto di H sul rimodellamento cardiaco
- Interazione di H sul sistema renina-angiotensina

Obiettivi secondari

- Misurazione delle concentrazioni plasmatiche
- Misurazione dello spessore della parete ventricolare sinistra
- Quantificazione dei livelli sierici di renina e angiotensina

D.Lgs 26/2014

Allegato VI

14-3-2014

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

Serie generale - n. 61

17. Razionale dello studio

1.1 Stato delle conoscenze (*Giustificare lo studio con adeguati riferimenti bibliografici*)

1.2 Originalità e/o interesse dello studio (*valore scientifico*)

1.3 Eventuali ricadute nell'ambito della salute pubblica umana e/o animale (*valore sociale*)

1.4 Eventuale impatto nel settore economico-industriale (*valore economico*)

1.5 Eventuali ricadute nell'ambito della formazione (*valore didattico*)

→ Valutazione tecnico-scientifica di MINSAL/ISS

D.Lgs 26/2014

Articolo 13

Art. 13.

Scelta dei metodi

3R

Reduction

~~Replacement~~

Refinement

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

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

D.Lgs 26/2014

Allegato VI

14-3-2014

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

Serie generale - n. 61

20. Dichiarazioni riferite all'Articolo 13, comma 2

a. Sostituzione (*Dichiarazione che la specie animale di cui si farà uso sono quelle a più basso sviluppo neurologico, nonché della mancanza di metodi alternativi, compatibili con l'obiettivo del progetto di ricerca*).

b. Riduzione (*Massima riduzione del numero di animali utilizzati, compatibile con gli obiettivi del progetto di ricerca*)

c. Affinamento (*Ottimizzazione della metodica per ridurre la sofferenza imposta all'animale durante l'esecuzione delle procedure*)

d. Rapporto danno/beneficio

3R Replacement
Reduction
Refinement

D.Lgs 26/2014

Allegato VI

14-3-2014

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

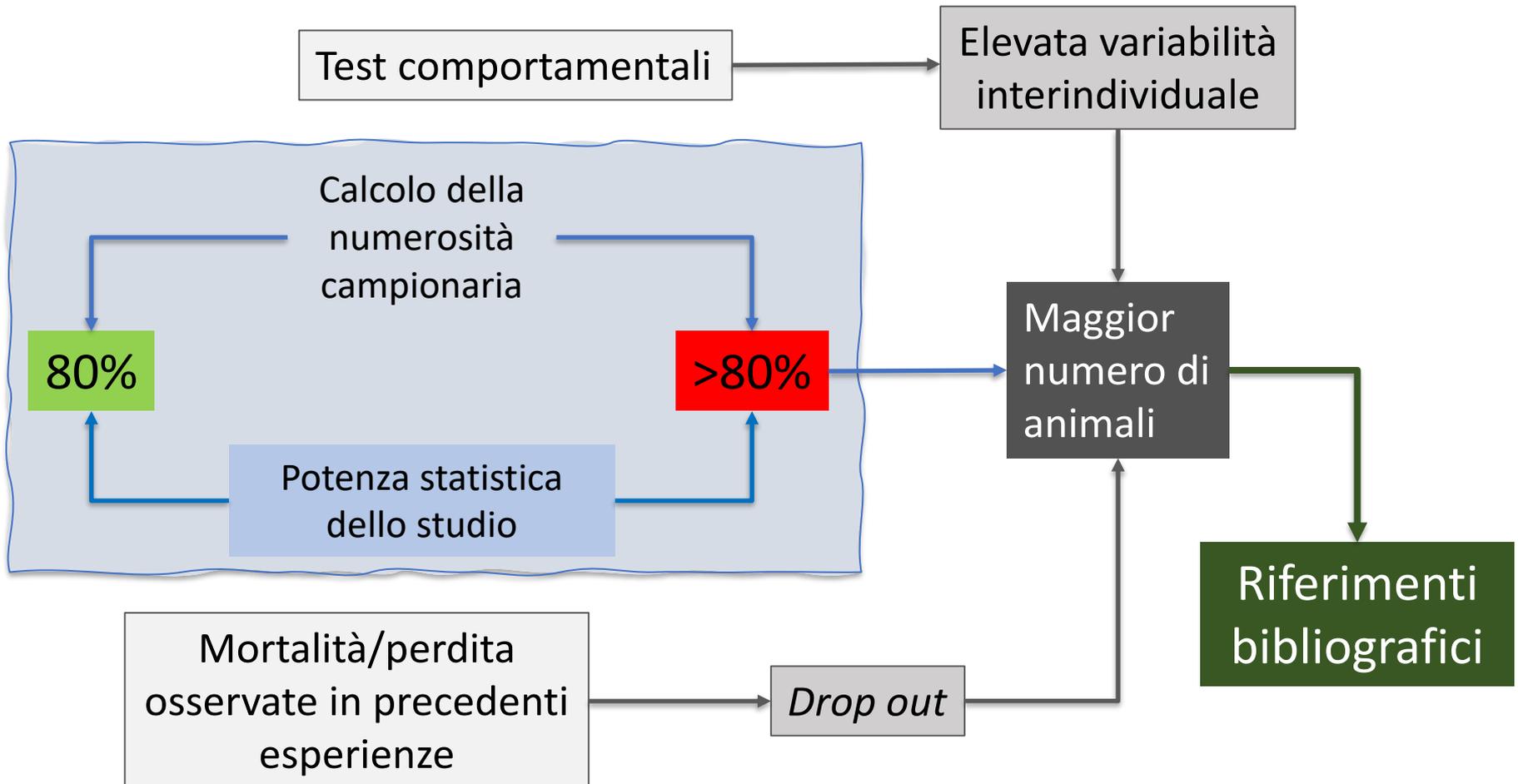
Serie generale - n. 61

Nel caso in cui non esistono modelli alternativi a quelli idonei e più appropriati per gli obiettivi del progetto di ricerca (cioè non è possibile applicare la sostituzione con modelli a più basso sviluppo evolutivo o sistemi *in vitro*), devono essere garantiti la massima riduzione della numerosità ed il perfezionamento delle procedure

3R Replacement
 Reduction
 Refinement

Popolazione in studio

Numerosità



D.Lgs 26/2014

Allegato VI

14-3-2014

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

Serie generale - n. 61

Affinamento

Riduzione

Manipolazione degli animali
Tempi di sperimentazione
Intensità degli effetti nocivi

Somministrazione di farmaci analgesici e/o
antiinfiammatori

Protezione delle caratteristiche
comportamentali della specie

Scale di valutazione

Scala	Punteggio
Grimace scale	3
Endpoints	
Postura (normale, ...)	1
Dispnea (sì/no)	1
Feci (sì/no)	1
Riduzione peso $\geq 20\%$	0
...	...
Totale	10



- Frequenza del monitoraggio
- Chi esegue il monitoraggio
- Azioni da intraprendere al raggiungimento di un certo punteggio
- Scheda per la registrazione dei punteggi

Punteggio

0-3: la sperimentazione continua;

4-8: la sperimentazione continua, monitoraggio più frequente, allertare veterinario;

9-14: è presente sofferenza: somministrare analgesici, monitoraggio più frequente, valutazione da parte del veterinario se continuare la sperimentazione;

≥ 15 : interruzione immediata della sperimentazione, eutanasia...

D.Lgs 26/2014

Allegato VI

14-3-2014

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

Serie generale - n. 61

20. Dichiarazioni riferite all'Articolo 13, comma 2

- a. Sostituzione (*Dichiarazione che la specie animale di cui si farà uso sono quelle a più basso sviluppo neurologico, nonché della mancanza di metodi alternativi, compatibili con l'obiettivo del progetto di ricerca*).
- b. Riduzione (*Massima riduzione del numero di animali utilizzati, compatibile con gli obiettivi del progetto di ricerca*)
- c. Affinamento (*Ottimizzazione della metodica per ridurre la sofferenza imposta all'animale durante l'esecuzione delle procedure*)

d. Rapporto danno/beneficio

3R Replacement
Reduction
Refinement

D.Lgs 26/2014

Allegato VI

14-3-2014

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

Serie generale - n. 61

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

Indicare in maniera **esaustiva** le procedure sperimentali

21.2 Considerazioni statistiche *(descrivere come è stato determinato il numero di animali necessari per lo studio)*

D.Lgs 26/2014

Allegato VI

14-3-2014

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

Serie generale - n. 61

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

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

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

Impiegare *humane endpoints* con appropriate scale di valutazione eventualmente associate ad altri parametri indicati dal ricercatore!

D.Lgs 26/2014

Allegato VI

14-3-2014

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

Serie generale - n. 61

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

Non risveglio

Lievi

Moderate

Gravi

Valutare la gravità delle singole procedure
e della loro totalità



Allegato VII

D.Lgs 26/2014

Allegato VII

14-3-2014

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

Serie generale - n. 61

Sezione II: Criteri di assegnazione

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

Allorché si assegna una procedura a una determinata categoria si tiene conto del tipo di procedura e di una serie di altri fattori. Tutti questi fattori sono considerati caso per caso.

I fattori relativi alla procedura comprendono:

- ▶ tipo di manipolazione, gestione;
- ▶ natura del dolore, della sofferenza, dell'angoscia o del danno prolungato causati dalla procedura (in tutti i suoi elementi) e relativa intensita', la durata, frequenza e molteplicita' delle tecniche impiegate;
- ▶ sofferenza cumulativa nell'ambito della procedura;
- ▶ impedimento del comportamento naturale, dovuto tra l'altro a limitazioni delle norme in materia di alloggiamento, allevamento e cura.

D.Lgs 26/2014

Allegato VII

14-3-2014

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

Serie generale - n. 61

Lievi

b) studio farmacocinetico, con somministrazione di dose unica, numero limitato di prelievi ematici (in totale <10% del volume circolante) e sostanza che non dovrebbe causare effetti avversi riscontrabili;

j) confinamento di breve durata (<24h) in gabbie metaboliche;

k) studi che comportano la privazione di breve durata del partner sociale, la messa in gabbia di breve durata di ratti o topi adulti socievoli;

Moderate

c) chirurgia in anestesia generale e somministrazione di idonei analgesici, associata a dolore, sofferenza o deterioramento delle condizioni generali post-chirurgici. Esempi: toracotomia, craniotomia, laparatomia, orchiectomia, linfadenectomia, tiroidectomia, chirurgia ortopedica con stabilizzazione efficace e trattamento delle lesioni, trapianto di organi con trattamento efficace dei rigetti, impianto chirurgico di cateteri o dispositivi biomedici (ad esempio trasmettitori telemetrici, mini-pompe, ecc.);

Gravi

e) modelli di induzione di tumori o tumori spontanei che si prevede causino malattia progressiva letale associata a dolore, angoscia o sofferenza moderati di lunga durata Ad esempio, tumori che causano cachessia, tumori ossei invasivi, tumori metastatizzati e tumori che causano ulcerazioni;

i) uso di gabbie metaboliche con limitazione grave del movimento per un lungo periodo;