

ETICA, BENESSERE ANIMALE E LE 3 R

ANGELO GAZZANO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

UNIVERSITÀ DI PISA





LA STORIA

Nel 1954 la Universities Federation for Animal Welfare (UFAW) decise di finanziare una ricerca sistematica sullo sviluppo di metodiche di laboratorio attente al benessere dell'animale.

William Russell, uno zoologo, e Rex Burch, un microbiologo, furono incaricati di valutare le tecniche di laboratorio da un punto di vista etico.

Nel 1956 essi prepararono un rapporto che presentarono alla UFAW e che costituì il nucleo centrale del loro libro che fu pubblicato nel 1958 col titolo: "The principles of humane experimental technique".





LA STORIA

Nel capitolo 4 del libro Russell e Burch descrivono cosa si intende con il principio delle 3 R.

- **The Removal of Inhumanity: The Three R's**
- **We turn now to consideration of the ways in which inhumanity can be and is being diminished or removed.**
- **REPLACEMENT** means the substitution for conscious living higher animals of insentient material.
- **REDUCTION** means reduction in the numbers of animals used to obtain information of a given amount and precision.
- **REFINEMENT** means any decrease in the incidence or severity of inhumane procedures applied to those animals which still have to be used.

The Principles of
Humane
Experimental
Technique

Russell, William

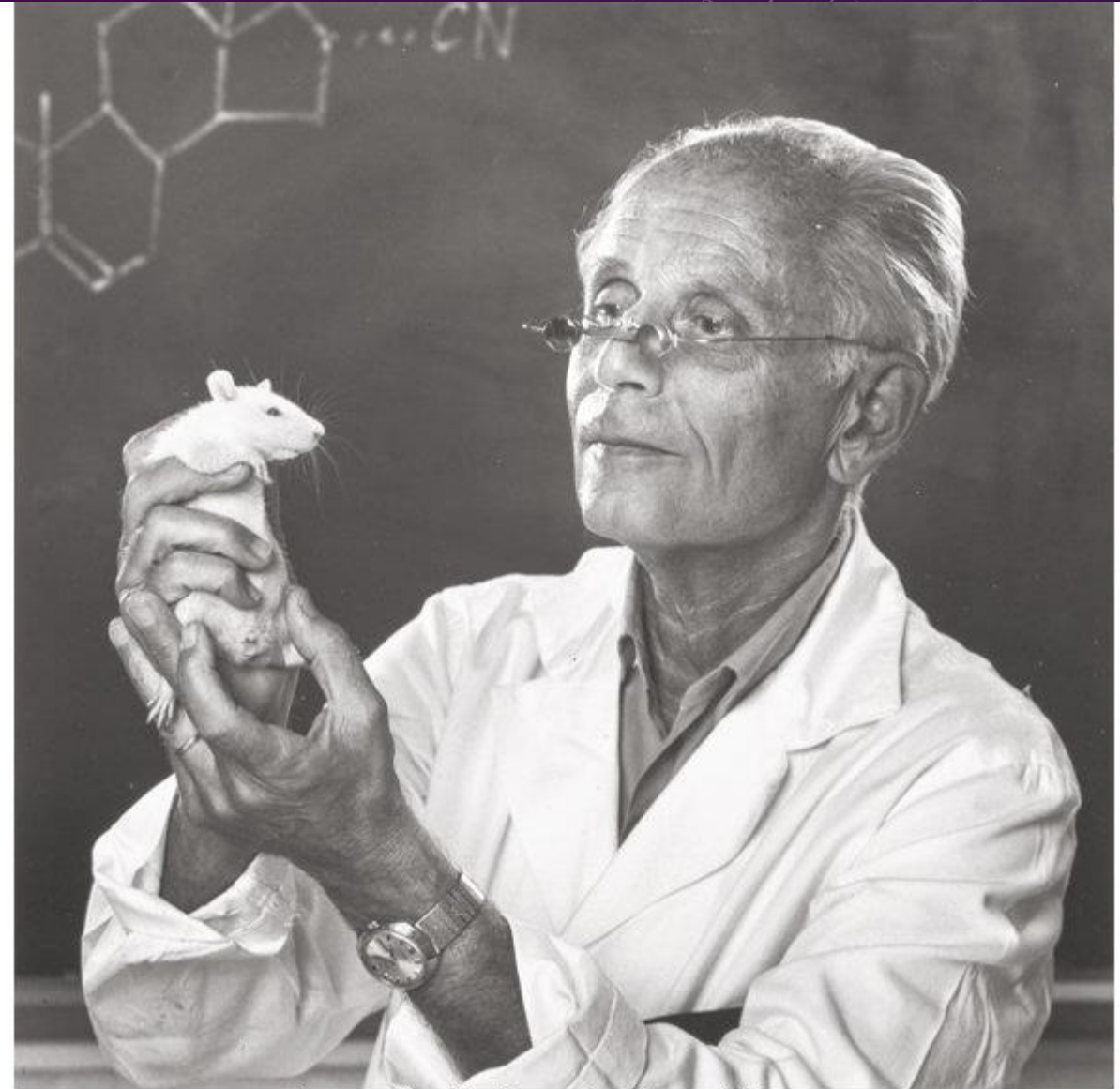
Note: This is not the actual book cover



Le ricerche di Hans Selye

La prima descrizione dello stress si deve ad un medico ungherese Hans Selye che nel 1936 conducendo un esperimento di farmacologia su dei ratti, notò la presenza di ulcere gastriche, atrofia del sistema immunitario, ingrossamento delle ghiandole surrenali, sia nei ratti sperimentali che in quelli di controllo.

Egli attribuì alle metodiche sperimentali (che prevedevano ripetute manipolazioni ed iniezioni) e non al farmaco tale fenomeno.



Imaged by Heritage Auctions, HA.com



Definizione di benessere

I primi tentativi di definire i requisiti necessari per garantire il benessere degli animali risalgono al 1965 con l'attività del Comitato Brambell che prese in esame lo stato di salute degli animali negli allevamenti intensivi e formulò alcuni requisiti minimi conosciuti come le CINQUE LIBERTA':

- 1) Libertà dalla sete, dalla fame e dalla malnutrizione.
- 2) Libertà dal disagio.
- 3) Libertà dal dolore e dalla malattia.
- 4) Libertà di esprimere un comportamento normale.
- 5) Libertà dallo stress e dalla paura.





Replacement

D.L. 26 del 4/3/2014

È consentito l'utilizzo di animali a fini scientifici o educativi soltanto quando, per ottenere il risultato ricercato, non sia possibile utilizzare altro metodo o una strategia di sperimentazione scientificamente valida, ragionevolmente applicabile che non implichi l'impiego di animali vivi.

Il presente decreto si applica ai seguenti animali:

a) ANIMALI VERTEBRATI VIVI NON UMANI, comprese:

1) forme larvali capaci di alimentarsi autonomamente;

2) forme fetali di mammiferi a partire dall'ultimo terzo del loro normale sviluppo;

b) CEFALOPODI VIVI.

Ratto Long Evans

Cri:LE

ETÀ IN SETTIMANE	MASCHIO	FEMMINA
	Prezzo - €	Prezzo - €
4	29,30	29,30
5	34,93	34,93
6	38,89	38,89
7	43,40	43,40
Settimana supplementare	Su richiesta	Su richiesta

Origine: Sviluppati dal Dr. Long ed Evans nel 1915 grazie ad un incrocio di diverse femmine del Wistar Institute con un maschio grigio. Trasferiti nel 1978 dal Canadian Breeding Farms and Laboratories presso Charles River. Riderivati nel 1978.

Colore del mantello: Albino con un cappuccio nero; occasionalmente albino con un cappuccio marrone.

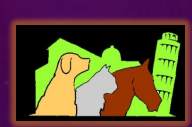
Coniglio New Zealand White

Cri:KBL(NZW)

ETÀ IN SETTIMANE	MASCHIO	FEMMINA
	Prezzo - €	Prezzo - €
fino a 6	146,83	146,83
7	175,73	175,73
8-11	225,25	225,25
12+	Su richiesta	Su richiesta
Coppie provenienti dallo stesso gruppo di allevamento * (fino a 12 settimane)	Su richiesta	Su richiesta
Femmina accoppiata	Su richiesta	Su richiesta

Origine: Creazione della colonia SPF al Kitayama Breeding Laboratories nel 1960. Creazione della colonia di fondazione presso Charles River nel 1991. Ceppo introdotto per isterectomia asettica nel 1999, proveniente da Charles River Francia. **Colore del mantello:** Albino.

* Coppia di conigli raggruppati dallo svezzamento fino alla spedizione



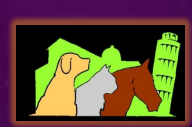
EURL ECVAM

European Union Reference Laboratory for
alternatives to animal testing

Le attività dell' EURL ECVAM sono:

- **Condurre ricerche e collaborare con iniziative di ricerca nell'UE.**
- **Coordinare e intraprendere studi di validazione di metodi alternativi per la valutazione di sicurezza di prodotti chimici.**
- **Diffondere informazioni e condividere le conoscenze tra le diverse discipline e settori.**
- **Promuovere metodi alternativi e l'applicazione dei principi delle 3 R nel contesto internazionale.**

<https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam>



Terio-epistemologia

La terio-epistemologia è una nuova disciplina che si occupa delle modalità (e criticità) con cui le conoscenze scientifiche sono acquisite attraverso le ricerche su modelli animali.

I modelli animali spesso non producono risultati trasferibili all'uomo.

I modelli animali sono imperfetti perché:

- la biologia tra le diverse specie è diversa e certe particolarità di una specie possono non essere ancora note o, peggio, ignorate da chi esegue la ricerca.
- Sono monitorati solo gli aspetti ambientali e biologici che il ricercatore ritiene importanti, tralasciandone altri, ad esempio la capacità dei roditori di udire gli ultrasuoni. Gli animali sono impossibilitati a gestire l'ambiente in cui vivono.

Introducing Therioepistemology: the study of how knowledge is gained from animal research

Joseph P Garner^{1,2}, Brianna N Gaskill³, Elin M Weber¹, Jamie Ahloy-Dallaire¹ & Kathleen R Pritchett-Corning^{4,5}

This focus issue of *Lab Animal* coincides with a tipping point in biomedical research. For the first time, the scale of the reproducibility and translatability crisis is widely understood beyond the small cadre of researchers who have been studying it and the pharmaceutical and biotech companies who have been living it. Here we argue that an emerging literature, including the papers in this focus issue, has begun to congeal around a set of recurring themes, which themselves represent a paradigm shift. This paradigm shift can be characterized at the micro level as a shift from asking “*what have we controlled for in this model?*” to asking “*what have we chosen to ignore in this model, and at what cost?*” At the macro level, it is a shift from viewing animals as tools (the furry test tube), to viewing them as patients in an equivalent human medical study. We feel that we are witnessing the birth of a new discipline, which we term *Therioepistemology*, or the study of how knowledge is gained from animal research. In this paper, we outline six questions that serve as a heuristic for critically evaluating animal-based biomedical research from a therioepistemological perspective. These six questions sketch out the broad reaches of this new discipline, though they may change or be added to as this field evolves. Ultimately, by formalizing therioepistemology as a discipline, we can begin to discuss best practices that will improve the reproducibility and translatability of animal-based research, with concomitant benefits in terms of human health and animal well-being.

LabAnimal. 2017; 46: 4 pp 103-113



La Talidomide

La talidomide è un farmaco che fu venduto negli anni cinquanta e sessanta (anche durante la guerra, come tranquillante per i soldati) come sedativo, anti-nausea e ipnotico, rivolto in particolar modo alle donne in gravidanza.

La talidomide causa danni all'embrione in una finestra di tempo breve, noto anche come "periodo critico" che si attesta tra i 20 ed i 36 giorni dopo la fecondazione, o 34 e 50 giorni dopo l'ultimo periodo mestruale.

Gli studi su animali da laboratorio, **NON GRAVIDI**, non avevano rilevato effetti tossici.

Nel 1962, esperimenti su topi gravidi dimostrarono che la talidomide provocava la nascita di nidiate con gravi malformazioni agli arti.



La talidomide



William McBride, che fu tra i primi medici a dare l'allarme sulla talidomide



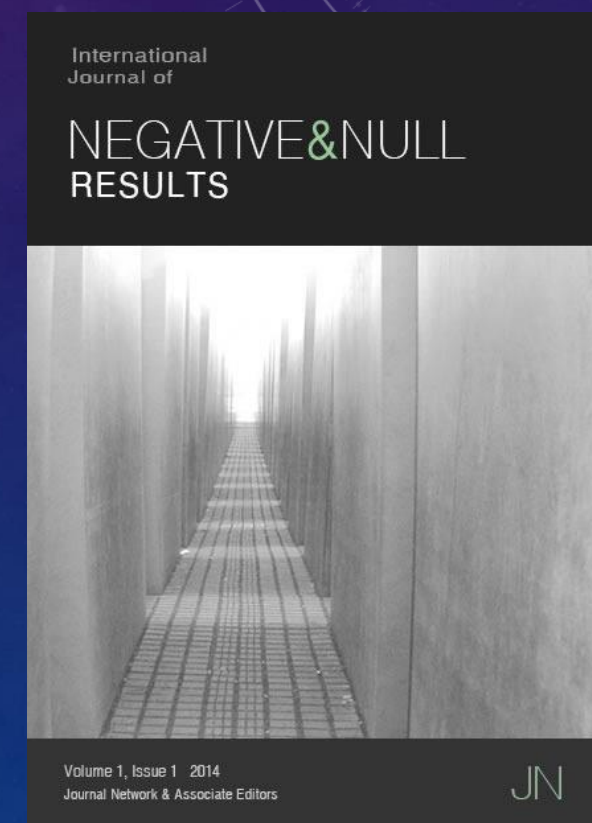
Frances Oldham Kelsey, farmacologa della FDA. Nel 1959 impedì che la talidomide fosse commercializzata negli USA.



Reduction

- **Esame accurato dello stato dell'arte per quel particolare argomento di ricerca.**
- **Evitare di ripetere esperimenti già eseguiti e che non hanno avuto esiti positivi, consultando riviste che pubblicano i risultati negativi delle ricerche.**
- **Analisi statistica preliminare per definire il numero di animali necessari per un esperimento in modo da ottenere risultati scientificamente validi.**
- **Effettuare uno studio pilota per determinare, ad esempio, il numero di variabili estranee al protocollo che possono influenzare la validità del risultato, e come tale variabilità possa richiedere un campione di una certa consistenza numerica**
- **Armonizzare il più possibile, a livello nazionale e internazionale, le metodologie utilizzate per test di tossicità e per ricerche di tipo biomedico.**

Journal of Pharmaceutical Negative Results





Refinement

La definizione di Refinement offerta da Russell e Burch recita: "simply to reduce to an absolute minimum the amount of stress imposed on those animals that are still used".

Russell e Burch indicavano che migliorare le procedure sperimentali implica:

- evitare casi di "DIRECT INHUMANITY", occupandosi del benessere animale durante un esperimento.
- evitare casi di "CONTINGENT INHUMANITY, ovvero migliorare la qualità di vita di un individuo durante tutte le procedure che accompagnano la sua vita.





Refinement

Nel 2005 è stata introdotta una nuova definizione di Refinement, da parte di Buchanan-Smith e colleghi:

“Any approach which avoids, alleviates or minimises the actual or potential pain, distress and other adverse effects suffered at any time during the life of the animals involved, or which enhances their well-being as far as possible.”

Ciò che è particolarmente rilevante in questa definizione è il riferimento a uno sforzo attivo e necessario per il miglioramento dello stato di benessere dell'animale sperimentale, dove benessere non è semplicemente assenza di malessere.

Oggi per REFINEMENT si intende la tutela del benessere dell'animale sperimentale durante l'esperimento vero e proprio e per tutta la vita che l'animale passa in laboratorio, dal trasporto fino all'eutanasia.

- Migliorare le condizioni di stabulazione.
- Migliorare le condizioni sperimentali
- Riabilitare e dare in adozione gli animali a fine esperimento: la 4^a R



Refinement

Laboratory animals 1997;31: 116-124

Happy animals make good science

Trevor Poole

Universities Federation for Animal Welfare, 8 Hamilton Close, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QD, UK

Summary

In this paper the question is posed whether it is not only better for the animal to be happy, but whether its state of mind may also have the potential to influence the scientific results derived from it. To ensure good science, the animal should have a normal physiology and behaviour, apart from specific adverse effects under investigation. There is a growing body of evidence from a wide variety of sources to show that animals whose well-being is compromised are often physiologically and immunologically abnormal and that experiments using them may reach unreliable conclusions. On scientific, as well as ethical grounds, therefore, the psychological well-being of laboratory animals should be an important concern for veterinarians, animal technicians and scientists.

Keywords Well-being; laboratory animals; endocrine; immune response; handling; experimental method

Migliorare le condizioni di stabulazione



≠



Stabulari a misura di animale in modo che possa interagire attivamente con l'ambiente e possa averne il controllo.

Un ambiente asettico e privo di stimoli sociali e fisici può non essere adatto per l'animale e renderlo un modello non attendibile. Ad esempio il suo sistema immunitario può non svilupparsi adeguatamente.





Refinement

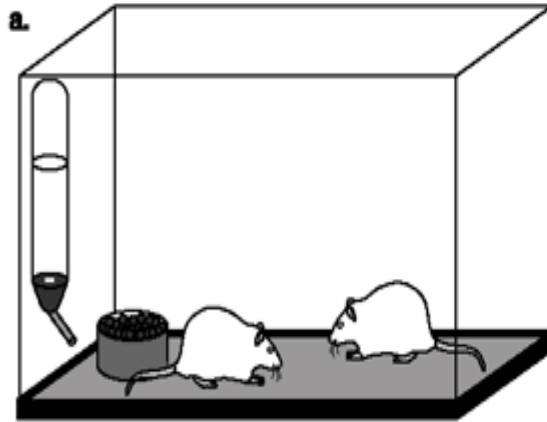
I fattori di cui si deve tener conto nella stabulazione sono:

- **FATTORI SOCIALI:** alcuni animali hanno abitudini di vita solitarie e la vita in gruppo, soprattutto se costituito da individui dello stesso sesso, è fonte di stress (topo maschio e coniglio maschio). Altri animali sono invece specie gregarie (ratto) e hanno la necessità di vivere in gruppi di adeguate dimensioni (non troppo numerosi da impedire la creazione di gerarchie stabili). È importante che il giovane animale possa crescere insieme alla madre e che sia evitato lo svezzamento precoce.
- **FATTORI FISICI:** temperatura, luminosità, umidità, rumorosità. Dimensione delle gabbie in base al numero ed alle caratteristiche degli animali (ad esempio abbastanza ampie da permettere il gioco nei giovani). Ogni cambiamento di gabbia è uno stress per animali che vivono in un mondo di odori e di feromoni territoriali. Arricchimento ambientale.

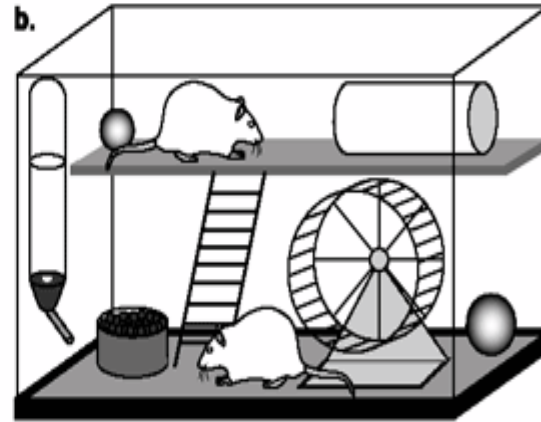




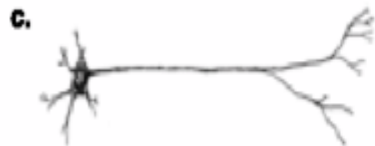
ARRICCHIMENTO AMBIENTALE



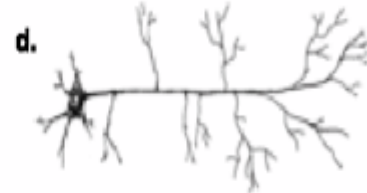
standard cage



enriched cage



appearance of nerve cells, mouse cerebrum



appearance of nerve cells, mouse cerebrum



Cerebral Cortex November 2015;25:4048-4061
doi:10.1093/cercor/bhu119
Advance Access publication June 5, 2014

Environmental Enrichment Duration Differentially Affects Behavior and Neuroplasticity in Adult Mice

Marianne Leger¹, Eleni Paizanis¹, Kwamivi Dzahini², Anne Quiedeville¹, Valentine Bouet¹, Jean-Christophe Cassel², Thomas Freret¹, Pascale Schumann-Bard¹ and Michel Boulouard¹

¹Normandie Universités, Université de Caen Basse-Normandie, Groupe Mémoire et Plasticité Comportementale (GMPc), EA 4259, F-14032, Caen, France and ²Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, UMR 7364, Université de Strasbourg, CNRS, Faculté de Psychologie, Groupe de Recherche NeuroMem 2905, 12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France



Available online at www.sciencedirect.com



APPLIED ANIMAL
BEHAVIOUR
SCIENCE

Applied Animal Behaviour Science 110 (2008) 294-304

www.elsevier.com/locate/applanim

Effects of early gentling and early environment on emotional development of puppies

Angelo Gazzano^{a,*}, Chiara Mariti^a, Lorella Notari^b,
Claudio Sighieri^a, Elizabeth Anne McBride^c



ARRICCHIMENTO AMBIENTALE



Il comportamento del topo

Il topo di laboratorio deriva dal topo domestico, animale notturno, abile scavatore ed arrampicatore, che costruisce nidi per regolare il microambiente, come riparo e per allevare i piccoli.

I topi non amano attraversare spazi aperti ma preferiscono restare vicino alle pareti.

I maschi sono fortemente territoriali mentre le femmine gravide o che allattano possono difendere in modo aggressivo il proprio nido.

I topi marcano con le urine il loro ambiente.





Il comportamento del ratto

Il ratto di laboratorio deriva dal ratto bruno (*Rattus norvegicus*) ed è un animale altamente sociale.

I ratti evitano gli spazi aperti ed usano l'urina per marcare i propri territori.

Sono animali notturni ed i ratti albinici, se possono, evitano aree con luminosità che superi i 25 lux.

I giovani ratti hanno uno spiccato comportamento esplorativo e dedicano molto tempo al gioco.





Requisiti generali per una stabulazione corretta dei roditori

- **Creare gruppi di animali stabili e compatibili, tenendo in considerazione il sesso, l'età, lo stato riproduttivo, la familiarità tra i soggetti, le precedenti esperienze di vita in gruppo.**
- **Gabbie con spazio sufficiente per il movimento, i normali comportamenti sociali (grooming e gioco) e con un arricchimento ambientale che riduca il rischio di stress sociale e di aggressività, permettendo all'animale di esprimere comportamenti specie-specifici (costruzione di nidi).**
- **Pavimento della gabbia solido con un substrato di adeguato spessore per permettere l'igiene, il comfort, lo scavare e la ricerca del cibo.**
- **Materiale da rosicchiare per prevenire la crescita dei denti e le stereotipie orali.**
- **Presenza di rifugi per riposare, per ottenere sicurezza, per poter arrampicarsi e gestire le interazioni sociali.**



Requisiti generali per una stabulazione corretta dei roditori

- **Barriere verticali o tubi in PVC per aumentare la complessità della gabbia, le vie di fuga e stimolare l'esplorazione.**
- **Materiale per il nido (carta soffice) per aumentare il comfort, per contribuire a regolare la temperatura e l'esposizione alla luce. Il materiale deve essere rosicchiato o sminuzzato dall'animale in modo da tenerlo impegnato in un'attività.**
- **Illuminazione appropriata per durata ed intensità.**
- **Dieta varia che fornisca la possibilità che il cibo sia disperso e cercato dall'animale.**
- **Protocolli di pulizia che tengano conto dell'importanza di odori e feromoni per i roditori.**
- **Arricchimenti ambientali in quantità sufficienti per non provocare contese per la loro gestione.**



Il comportamento del coniglio

Il coniglio di laboratorio deriva dal coniglio selvatico che vive in gruppi sociali costituiti da 1-4 maschi e da 1-9 femmine.

Il gruppo difende un territorio ma condivide un'home range anche con altri gruppi.

Le femmine costruiscono nidi sotterranei dove partorisce i piccoli che sono alimentati una sola volta al giorno.

Sono animali notturni e spendono gran parte del tempo a consumare erba e vegetali. L'erba ha un'azione importante nel consumare i denti a crescita continua.

I maschi sono molto aggressivi nei confronti di altri maschi. Anche per i conigli è importante la comunicazione feromonale.





Requisiti generali per una stabulazione corretta del coniglio

- La forma di stabulazione migliore è quella in recinti a terra.
- Le gabbie dovrebbero avere una piattaforma sollevata e ampie a sufficienza per permettere all'animale di saltare e di rizzarsi sulle zampe posteriori anche per giocare.
- Il pavimento dovrebbe essere solido con 2-5 cm di substrato per permettere il foraggiamento e lo scavare.
- Lo spazio deve possedere un adeguato arricchimento ambientale.
- I gruppi di animali dovrebbero essere stabili, creati quando gli animali sono sessualmente immaturi.
- I maschi interi devono essere separati dagli altri maschi alla maturità sessuale (12-14 settimane) e stabulati singolarmente, in contatto visivo ed olfattivo con gli altri conigli.
- Devono essere forniti nidi con materiale per tappezzarli.
- Sistemare barriere visive in modo che i conigli possano sottrarsi alle interazioni sociali.
- Fornire fieno per permettere il foraggiamento e materiale da rodere, come arricchimento e per prevenire la crescita dei denti.
- Fornire tubi di dimensioni adeguate che simulino la presenza di cunicoli.
- Permettere una buona visibilità al di fuori del recinto con reti o sbarre in modo che i conigli possano vedere le persone che si avvicinano.



Requisiti generali per una stabulazione corretta del coniglio





Refinement

- **MANIPOLAZIONE:** effettuare le manipolazioni nel modo corretto ed abituare l'animale ad essere manipolato per ridurre lo stress. Iniziare fin da giovani a toccare gli animali. Nei ratti si può mimare il comportamento di gioco che hanno con i propri simili, accarezzandoli sul dorso e sull'addome.





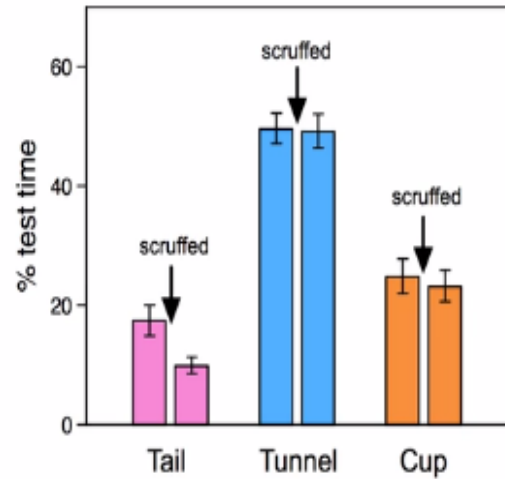
Refinement





Handling after scruff restraint

Voluntary interaction with handler before & after scruff handling



- ▶ Scruff restraint does not reverse taming by tunnel or cup handling
- ▶ Only mice picked up by tail reduce interaction after scruff restraint

Mean \pm sem, n = 24 cages per method, three strains combined

(Hurst & West 2010 *Nature Methods* 7: 825)

Methods differ before and after scruffing, $P < 0.001$

Scruff restraint

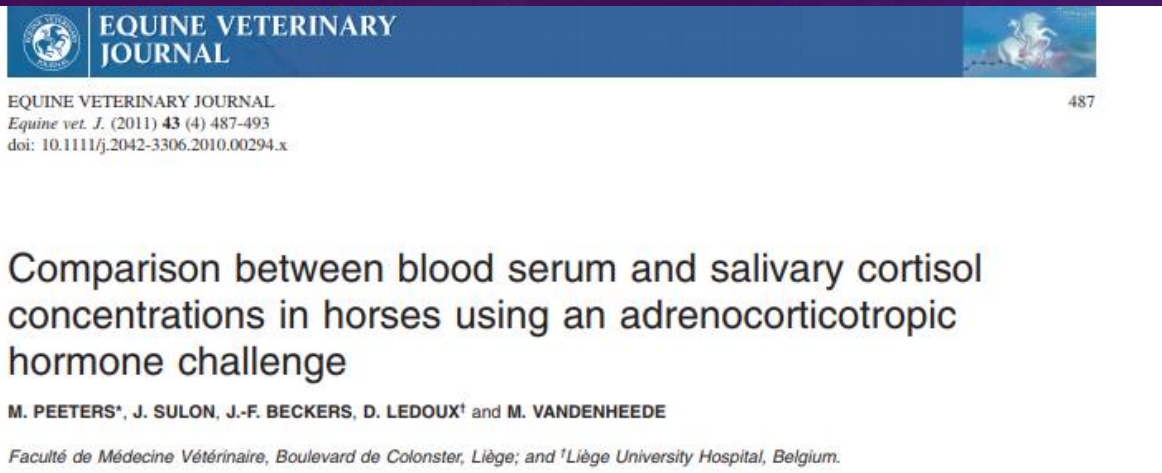
▶ Tunnel



REFINEMENT

Refinement

- **Utilizzare metodiche sperimentali meno invasive.**



Migliorare le condizioni sperimentali



- **Abituare gli animali alle attrezzature sperimentali.**
- **Addestrare gli animali a cooperare con le procedure.**
- **Utilizzare anestetici e soprattutto analgesici nel periodo post operatorio.**
- **Non riutilizzare gli animali in esperimenti che provochino sofferenza elevata.**



Refinement

NC3Rs National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research

The Mouse Grimace Scale

Research has demonstrated that changes in facial expression provide a means of assessing pain in mice.

The specific facial action units shown below have been used to generate the Mouse Grimace Scale. These action units increase in intensity in response to post-procedural pain and can be used as part of a clinical assessment.

The action units should only be used in awake animals. Each animal should be observed for a short period of time to avoid scoring brief changes in facial expression that are unrelated to the animal's welfare.

	Not present "0"	Moderately present "1"	Obviously present "2"
Orbital tightening • Closing of the eyelid (narrowing of orbital area) • A wrinkle may be visible around the eye			
Nose bulge • Bulging on the bridge of the nose • Vertical wrinkles on the side of the nose			
Cheek bulge • Bulging of the cheeks			
Ear position • Ears rotate outwards and/or backwards, away from the face • Ears may fold to form a 'pocket' shape • Space between the ears increases			
Whisker change • Whiskers are either pulled back against the cheek, or pulled forward to 'stand on end' • Whiskers may clump together • Whiskers lose their natural 'downward' curve			

Read the original paper: Langford DJ, Bailey M, Chanda SM, Clarke RS, Dickinson TE, Ellis S, Ghosh S, Grigg R, Hughes J, Jensen-Kjær T, Leighton-Palmer SA, Moberg BA, Niswender G, Pritchard M, Steiner AD, Wang D, Van der Weyer MK, Wainman FAW, Ferrel MG. Only 40, 40, 20. S910. *Diagnosis of facial expressions of pain in the laboratory mouse*. *Nature Methods* 7(5): 497-498. doi:10.1038/nmeth1439

For guidance on using the Mouse Grimace Scale, research papers that describe this technique and for grimace scales in other species, visit www.nc3rs.org.uk. To request copies of this poster, please email enquiries@nc3rs.org.uk. The NC3Rs provides a range of 3Rs resources at www.nc3rs.org.uk/resources. Images kindly provided by Dr Jeffrey Mogk, McGill University.

NC3Rs National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research

The Rat Grimace Scale

Research has demonstrated that changes in facial expression provide a means of assessing pain in rats.

The specific facial action units shown below have been used to generate the Rat Grimace Scale. These action units increase in intensity in response to post-procedural pain and can be used as part of a clinical assessment.

The action units should only be used in awake animals. Each animal should be observed for a short period of time to avoid scoring brief changes in facial expression that are unrelated to the animal's welfare.

	Not present "0"	Moderately present "1"	Obviously present "2"
Orbital tightening • Closing of the eyelid (narrowing of orbital area) • A wrinkle may be visible around the eye			
Nose/cheek flattening • Flattening and elongation of the bridge of the nose • Flattening of the cheeks (potentially sunken look)			
Ear changes • Ears curl forwards and are angled forward to form a 'pointed' shape • Space between the ears increases			
Whisker change • Whiskers stiffen and angle along the face • Whiskers may 'clump' together • Whiskers lose their natural 'downward' curve			

Read the original paper: Bocklandt SO, Sengen PE, Zakaria A, Tuttle AH, Marsh LJ, Westhof JB, Mapplebeck JC, West D, Zhou B, Zhang H, McDowell JJ, Mogk JM, Mogk JJ. 2013. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular Pain* 7: 25. doi:10.1186/1745-0174-7-25

For guidance on using the Rat Grimace Scale, research papers that describe this technique and for grimace scales in other species, visit www.nc3rs.org.uk. To request copies of this poster, please email enquiries@nc3rs.org.uk. The NC3Rs provides a range of 3Rs resources at www.nc3rs.org.uk/resources. Images kindly provided by Dr Jeffrey Mogk, McGill University.

NC3Rs National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research



The Rabbit Grimace Scale

Research has demonstrated that changes in facial expression provide a means of assessing pain in rabbits.

The specific facial action units shown below comprise the Rabbit Grimace Scale. These action units increase in intensity in response to post-procedural pain and can form part of a clinical assessment alongside other validated indices of pain.

The action units should only be used in awake animals. Each animal should be observed for a short period of time to avoid scoring brief changes in facial expression that are unrelated to the animal's welfare.

	Action units		
	Not present "0"	Moderately present "1"	Obviously present "2"
Orbital tightening • Closing of the eyelid (narrowing of orbital area) • A wrinkle may be visible around the eye			
Cheek flattening • Flattening of the cheeks. When 'obviously present', cheeks have a sunken look. • The face becomes more angular and less rounded			
Nostril shape • Nostrils (nares) are drawn vertically forming a 'V' rather than 'U' shape • Nose tip is moved down towards the chin			
Whisker shape and position • Whiskers are pushed away from the face to 'stand on end' • Whiskers stiffen and lose their natural downward curve • Whiskers increasingly point in the same direction. When 'obviously present', whiskers move downwards			
Ear shape and position • Ears become more tightly folded / curled (more cylindrical) in shape • Ears rotate from facing towards the source of sound to facing towards the hindquarters • Ears may be held closer to the back or sides of the body			

Read the original paper: Keating SCL, Thomas AA, Rickwood PA, Leach MC. 2012. Evaluation of EMA criteria for preventing pain during otoscopy of rabbits: Changes in physiological, behavioural and facial expression responses. *PLoS ONE* 7(5): e34457. doi:10.1371/journal.pone.0044457

For guidance on using the Rabbit Grimace Scale, additional images of each action unit, research papers that describe this technique, and for grimace scales in other species, visit www.nc3rs.org.uk/resources. To request copies of this poster, please email enquiries@nc3rs.org.uk. The NC3Rs provides a range of 3Rs resources at www.nc3rs.org.uk/resources. Images kindly provided by Dr Matthew Leach, Newcastle University and Dr Patricia Hedderley, Swedish University of Agricultural Sciences. The Rabbit Grimace Scale would not have been developed without the continuing work of the Pain and Animal Welfare Sciences Group (PAWS) at Newcastle University.

- Riconoscere i segni di dolore e malattia degli animali ed intervenire rapidamente.
- Effettuare periodicamente analisi microbiologiche su animali sentinella per individuare patologie latenti.



The rat grimace face

1. Orbital Tightening

Rats in pain display a narrowing of the orbital area, a tightly closed eyelid, or an eye squeeze. An eye squeeze is defined as the orbital muscles around the eyes being contracted. The nictitating membrane may be visible around the eye and becomes more pronounced as the pain intensifies. As a guideline, any eye closure that reduces the eye size by more than half should be coded as a "2". *Note that sleeping rats display closed eyes, but of a relaxed nature, whereas a rat in pain may display a closed eye with tight orbital muscles. Photographs of sleeping rats should not be taken and/or coded.



"0"

"1"

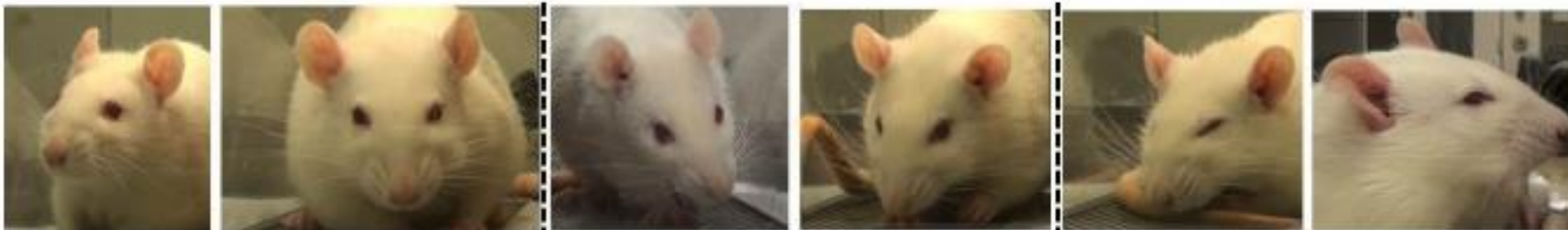
"2"



The rat grimace face

2. Nose/Cheek Flattening

Rats in pain display a *lack* of bulge on top of the nose (i.e., a flattening of the nose). In the “no pain” condition a clear bulge is present at the bridge of the nose. The whisker pads are also rounded and slightly puffed out, leaving a clear crease between the pads and the cheek. When in pain, the bridge of the nose flattens and elongates, causing the whisker pads to flatten. At this time the crease between the pads and the cheek is no longer present. In frontal headshots, the nose may appear narrower and longer.



“0”

“1”

“2”



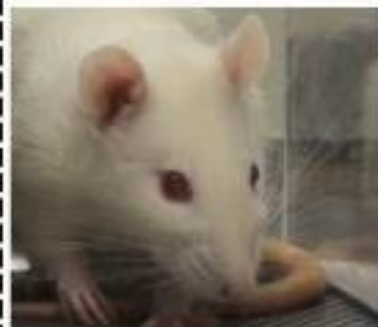
The rat grimace face

3. Ear Changes (Position, Orientation, Shape)

The ears of rats in pain may be curled and pointed more than in the baseline position. In the baseline position ears are roughly perpendicular to the head, face forward, and are angled slightly backward. Importantly, the ears also have a rounded shape. In pain, the ears tend to fold, curl inwards and are angled forward. This curling of the ears tends to result in a “pointed” shape of the ears. In pronounced pain states, the ears are angled outward and are held close to 45° away from both the perpendicular axis and the nose. As a result, the space between the ears may appear wider relative to baseline.



“0”



“1”



“2”



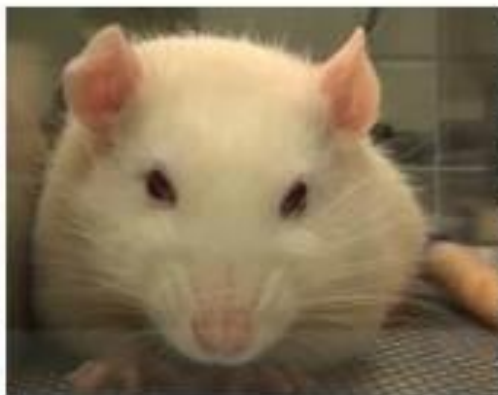
The rat grimace face

4. Whisker Change

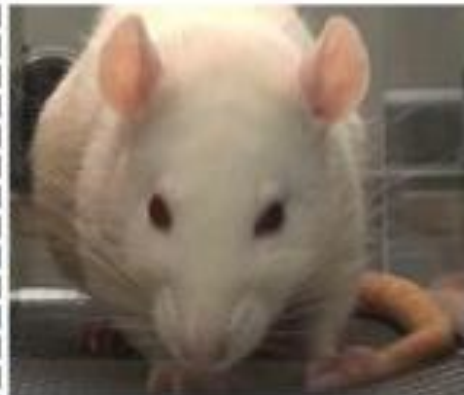
Rats in pain have whiskers that have moved from the baseline position and orientation. Whiskers start relaxed and drooping slightly downwards and, as pain progresses, tension in the pads increases and they become angled back along the head. In pain, the whisker pad is contracted causing the whiskers to bunch and be directed outwards away from the face. This gives the appearance of the whiskers as “standing on end”. As follicles become tense, whiskers are closer together and are less distinct.



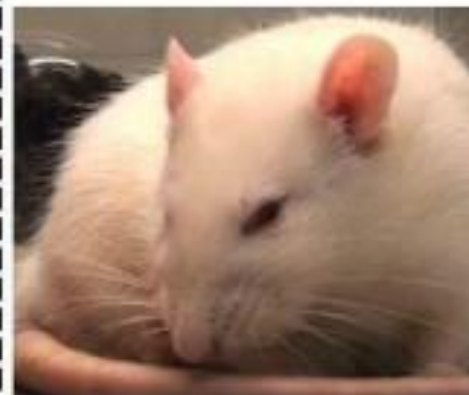
“0”



“1”









“2”





The rabbit grimace face

Not present "0"	Moderately present "1"	Obviously present "2"
		
		
<p>Orbital tightening</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Closing of the eyelid (narrowing of orbital area)▪ A wrinkle may be visible around the eye		



The rabbit grimace face

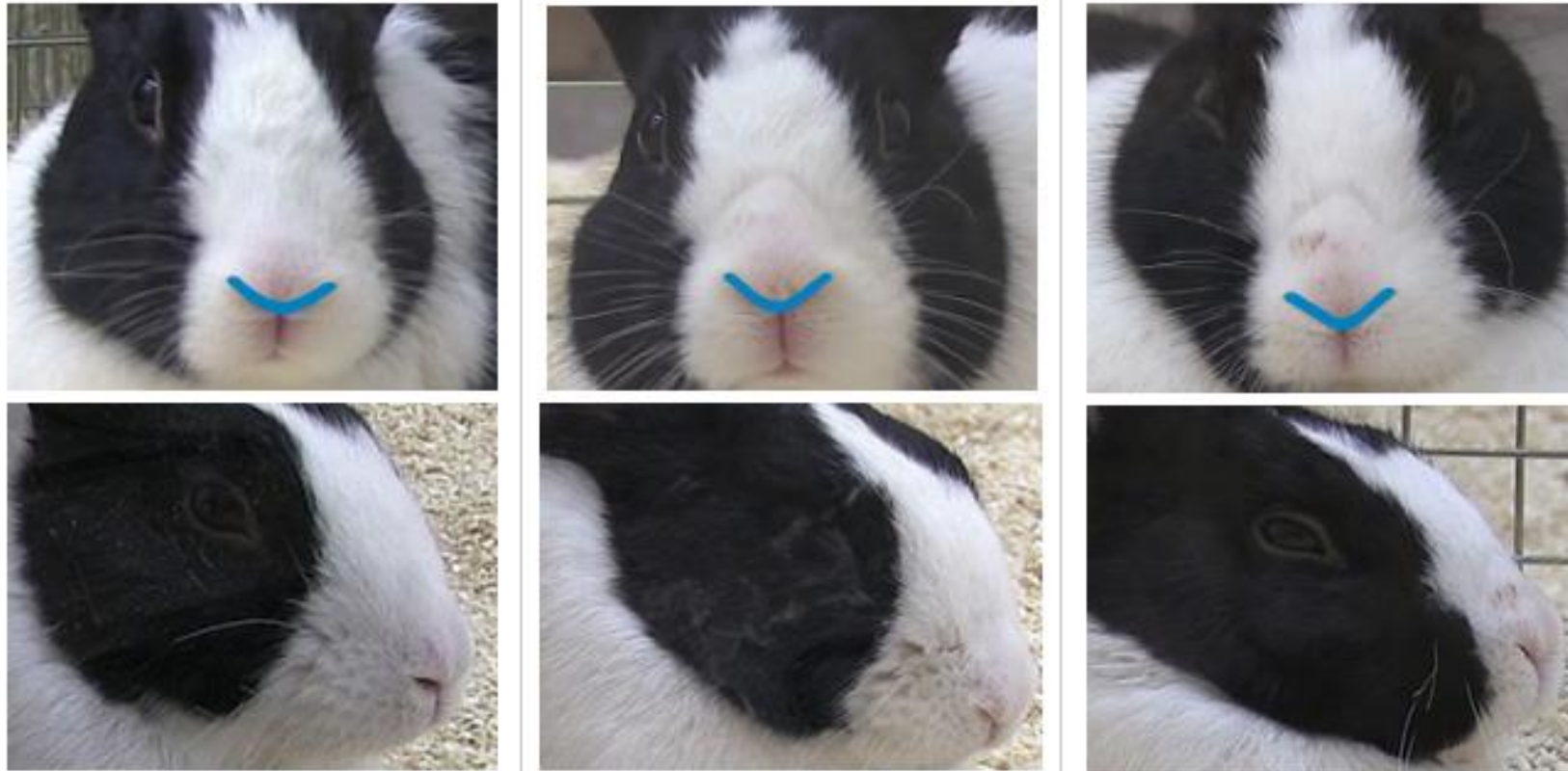


Cheek flattening

- Flattening of the cheeks. When 'obviously present', cheeks have a sunken look.
- The face becomes more angular and less rounded



The rabbit grimace face

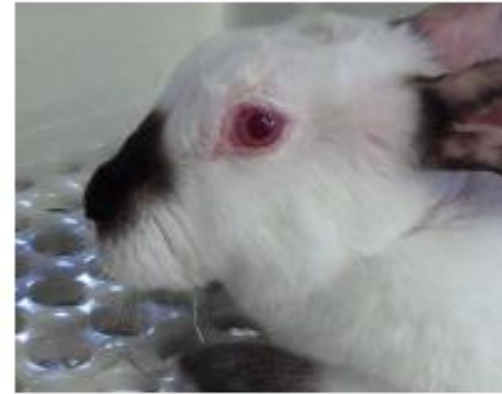


Nostril shape

- Nostrils (nares) are drawn vertically forming a 'V' rather than 'U' shape
- Nose tip is moved down towards the chin



The rabbit grimace face



Whisker shape and position

- Whiskers are pushed away from the face to 'stand on end'
- Whiskers stiffen and lose their natural, downward curve
- Whiskers increasingly point in the same direction. When 'obviously present', whiskers move downwards



The rabbit grimace face



Ear shape and position

- Ears become more tightly folded / curled (more cylindrical) in shape
- Ears rotate from facing towards the source of sound to facing towards the hindquarters
- Ears may be held closer to the back or sides of the body

Lo score medio

	A	B	C	D	E	F	G
1	Photo ID#	Orbital	Nose	Cheek	Ears	Whiskers	MGS
2	1	2	1	1	2	1	1.4
3	2	0	0	1	0	1	0.4
4	3	1	2	2	2	1	=AVERAGE(B4:F4)



RIABILITARE

- Riabilitare e dare in adozione gli animali a fine esperimento. (la 4^a R)

Adozioni animali da laboratorio



Si rende noto che la Circolare del Ministero della Salute, n.6 del 14 maggio 2001, applicativa del Decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 116, in materia di protezioni degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici, pone tra gli obiettivi prioritari ed irrinunciabili del decreto stesso (relativamente ai quali e' richiesta una particolare attenzione agli utilizzatori degli animali destinati alla ricerca) la facoltà conferita al medico veterinario, ai sensi dell'art. 6, comma 4, di assumere la decisione di mantenere in vita gli animali al termine della sperimentazione, con conseguente applicazione dell'istituto dell'affidamento in adozione, nei casi in cui le condizioni di salute degli animali lo consentano e allorquando pervengano "richieste di affido in adozione da parte di associazioni animaliste, di privati o di comuni".

A tale riguardo si invitano gli interessati all'adozione di animali utilizzati nella ricerca biomedica di questa Università, ad inoltrare la relativa domanda.