

“Corso di base in materia di protezione degli animali utilizzati a fini scientifici”

ANIMAL CARE, SALUTE E GESTIONE

Università degli Studi di Pisa

Pisa, 5 – 6 Novembre 2018

Omar Leoni, DVM, Veterinario Designato, Istituto Superiore di Sanità

Specialista in scienza e medicina degli animali da laboratorio

omar.leoni@iss.it

Goals

- Allegato III: requisiti per gli stabilimenti e per la cura e la sistemazione degli animali.
- La ricezione degli animali
- Micro e macroambiente
- Tecniche di manipolazione e contenimento
- Gli arricchimenti
- Osservazione degli animali

Benessere degli animali utilizzati a fini scientifici

Responsabile del progetto

Ricercatori

Tecnici di stabulario



Responsabile delle esecuzioni
degli esperimenti

Responsabile del benessere

Veterinario designato

D.Lgs. 26/2014, attuazione della Direttiva Europea 2010/63/UE
sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici

D.Lgs. 26/2014

Art 24

Veterinario Designato

Ciascun allevatore, fornitore o utilizzatore deve disporre di un medico veterinario, esperto in medicina degli animali da laboratorio, in possesso dei requisiti di esperienza e di formazione specifica, che **prescrive le modalità per il benessere e il trattamento degli animali**



Art 3 comma 1 lettera h
Responsabile del benessere, la persona responsabile del benessere e dell'assistenza degli animali e del funzionamento delle attrezzature di uno o più stabilimenti

Art. 23

Disciplina del personale abilitato

1-...

2-Il personale dispone di un livello di istruzione e di formazione adeguato, acquisito, mantenuto e dimostrato secondo le modalità definite con decreto del Ministero sulla base degli elementi di cui all'allegato V del presente decreto, per svolgere una delle seguenti funzioni:

- a) La realizzazione di procedure su animali
- b) La concezione delle procedure e di progetti
- c) La cura degli animali
- d) La soppressione degli animali.

3-...

4-Il personale nell'espletamento delle funzioni di cui alla lettera a), c) o d) del comma 2, opera sotto la supervisione della persona responsabile del benessere, dell'assistenza degli animali e del funzionamento delle attrezzature di cui all'art. 20 comma 4, lettera c), finché non abbia dato prova del possesso delle competenze richieste.

Raccomandazioni Europee 2007/526/CE relative alla sistemazione e alla tutela degli animali impiegati a fini sperimentali o altri fini scientifici

Direttiva Europea 63/2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici

26/2014

Art 22

Requisiti per impianti, attrezzature, sistemazione e cura degli animali

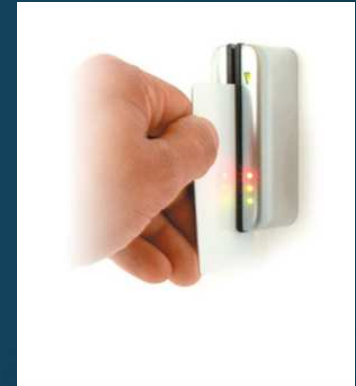
Allegato III

Requisiti per gli stabilimenti e per la cura e la sistemazione degli animali

Sezione A generale

Sezione B specifica

Allegato III sezione A



1-STRUTTURE FISICHE

1.1-Funzioni e progetto generali:

...progettate in modo da offrire un ambiente che tenga conto delle **esigenze fisiologiche ed etologiche** delle specie da ospitare

...studiate in modo da impedire **l'accesso ai non addetti** nonché **l'entrata o la fuga di animali**

...è previsto un **programma di manutenzione** degli edifici e delle attrezzature

Allegato III sezione A

1.2-Locali di permanenza

...essere garantita la **pulizia periodica** ed efficace dei locali

Muri e pavimenti rivestiti con materiali resistenti e innocui per la salute degli animali

Non possono essere stabulate nello stesso locale **specie tra loro incompatibili** come predatori e prede o animali che necessitano di **condizioni ambientali diverse**

1.3-Sale per procedure a finalità generale o specifica

Sale per le procedure diverse dagli ambienti di permanenza

Ambienti separati per alloggiare animali malati o feriti

Ambienti isolati per la quarantena dove gli animali appena acquisiti possono stazionare in attesa che sia determinato il loro stato di salute riducendo al minimo il rischio per gli animali già presenti

Allegato III sezione A

1.4-Locali di servizio

Locali di stoccaggio/magazzini resi inaccessibili a **vermi ed insetti** per salvaguardare la qualità degli alimenti

Spazi adeguati della stanza di lavaggio sia per contenere i macchinari per la disinfezione e pulizia del materiale utilizzato, sia per **permettere una netta distinzione tra l'afflusso di materiale sporco da quello pulito** e per non infettare il materiale e le attrezzature appena lavate



mantenuti a 10°C



Lavabeverini



Autoclave



Lavagabbie

Allegato III sezione A



2-AMBIENTE E RELATIVO CONTROLLO

2.1-Ventilazione e temperatura: la temperatura deve essere misurata e registrata ogni giorno e deve essere adattata alle specie presenti e alle fasce di età. Deve essere garantito che la circolazione dell'aria, i livelli di polvere e la concentrazione di gas siano mantenuti entro limiti consentiti per non risultare nocivi agli animali ospitati e agli operatori.

2.2-Illuminazione: deve essere garantito un fotoperiodo regolare e un'intensità luminosa adatta alle varie specie. Nel caso di mantenimento di animali albinici bisogna tenere conto della loro sensibilità alla luce.

2.3-Rumore: il livello dei rumori, compresi gli ultrasuoni, non deve nuocere al benessere degli animali.

2.4-Impianti di allarme: presenza di allarmi per garantire e mantenere i servizi essenziali. Istruzioni chiare sulle procedure di emergenza ben visibili a tutti

Allegato III sezione A

3-Cura degli animali

3.1-Salute

Gli stabilimenti sono dotati di una **strategia che garantisca il mantenimento di uno stato di salute degli animali che salvaguardi il benessere degli animali e risponda ai requisiti scientifici**. Tale strategia comprende un controllo sanitario periodico, un programma di sorveglianza microbiologicae definisce parametri e procedure sanitari per l'introduzione di nuovi animali.

Gli animali sono sottoposti ad almeno un controllo giornaliero effettuato da una persona competente Tali controlli garantiscono che tutti gli animali malati o feriti siano individuati e che si adottino misure adeguate.

Monitoraggio sanitario degli animali

I controlli sanitari sono essenziali per avere animali in buona salute e per certificare lo stato sanitario. Le linee guida Felasa danno indicazioni su quali controlli sia necessario eseguire e con quale frequenza. La scelta deve tenere in considerazione anche le caratteristiche dello stabulario, se convenzionale, barrierato, se con gabbie standard con o senza filtro, gabbie ventilate individualmente e le specie/ceppo ospitate.

Working Party Report

Laboratory Animals
2014, Vol. 48(3) 178–192
© The Author(s) 2014
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/
journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0023677213516312
la.sagepub.com

FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units

FELASA working group on revision of guidelines for health monitoring of rodents and rabbits: M Mähler (Convenor)^{1,2}, M Berard^{3,4}, R Feinstein^{5,6}, A Gallagher^{7,8}, B Ilgen-Witke^{9,10}, K Pritchett-Corning^{11,12,13} and M Raspa^{14,15}




Table 4. Recommended infectious agents to monitor and frequencies of monitoring for rats (*Rattus norvegicus*).

	Every 3 months	Annually
Viruses		
Parvoviruses:		
Kilham rat virus	x	
Rat minute virus	x	
Rat parvovirus	x	
Tokara's H-1 virus	x	
Pneumonia virus of mice	x	
Rat coronavirus/Strokeberrydendritic virus	x	
Rat heilshuis	x	
Herpesviruses		
Mouse adenovirus type 1 (F1)		x
Mouse adenovirus type 2 (R07)		x
Rotavirus type 2		x
Sentinel virus		x
Bacteria and fungi		
<i>Chloridriam piliforme</i>	x	
<i>Yersinia</i> spp.		x
If positive, speciation for <i>H. salis</i> is recommended		
Mycoplasma pulmonis	x	
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	x	
<i>Streptococcus</i> (haemolytic) (not group III)	x	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	x	
Clear-associated respiratory bacillus		x
<i>Pneumocystis</i> spp.		x
<i>Salmoneella</i> spp.		x
<i>Streptobacillus moniliformis</i>		x
Parasites		
Endo- and ectoparasites (reported to the genus level)	x	
Additional agents*		
Bacteria and fungi:		
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		x
<i>Corynebacterium Aebischeri</i>		x
<i>Exophiala carotii</i>		x
<i>Klebsiella aerogenes</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>		x
Other Pasteurellales†		x
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		x
<i>Staphylococcus aureus</i>		x
Others as necessary		

All agents listed should be reported if found in diagnostic examinations irrespective of when they are found.
*Testing for these agents is optional and should be pursued if there is a specific need. Frequency of testing will depend on local circumstances.
†The acknowledgement that the inclusion of the Pasteurellales family is controversial. Screening for the family can be conducted should the facility wish, and the difficulty of some commercial kits to correctly identify *Pasteurella pneumotropica*, as well as the benefits of the correct phenotypic classification, should also be acknowledged.

Table 4. Recommended infectious agents to monitor and frequencies of monitoring for rats (*Rattus norvegicus*).

	Every 3 months	Annually
Viruses		
Parvoviruses:		
Kilham rat virus	x	
Rat minute virus	x	
Rat parvovirus	x	
Tokara's H-1 virus	x	
Pneumonia virus of mice	x	
Rat coronavirus/Strokeberrydendritic virus	x	
Rat heilshuis	x	
Herpesviruses		
Mouse adenovirus type 1 (F1)		x
Mouse adenovirus type 2 (R07)		x
Rotavirus type 2		x
Sentinel virus		x
Bacteria and fungi		
<i>Chloridriam piliforme</i>	x	
<i>Yersinia</i> spp.		x
If positive, speciation for <i>H. salis</i> is recommended		
Mycoplasma pulmonis	x	
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	x	
<i>Streptococcus</i> (haemolytic) (not group III)	x	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	x	
Clear-associated respiratory bacillus		x
<i>Pneumocystis</i> spp.		x
<i>Salmoneella</i> spp.		x
<i>Streptobacillus moniliformis</i>		x
Parasites		
Endo- and ectoparasites (reported to the genus level)	x	
Additional agents*		
Bacteria and fungi:		
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		x
<i>Corynebacterium Aebischeri</i>		x
<i>Exophiala carotii</i>		x
<i>Klebsiella aerogenes</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>		x
Other Pasteurellales†		x
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		x
<i>Staphylococcus aureus</i>		x
Others as necessary		

All agents listed should be reported if found in diagnostic examinations irrespective of when they are found.
*Testing for these agents is optional and should be pursued if there is a specific need. Frequency of testing will depend on local circumstances.
†The acknowledgement that the inclusion of the Pasteurellales family is controversial. Screening for the family can be conducted should the facility wish, and the difficulty of some commercial kits to correctly identify *Pasteurella pneumotropica*, as well as the benefits of the correct phenotypic classification, should also be acknowledged.

Allegato III sezione A

3.2-Alloggiamento e arricchimento

Alloggiamento (gruppi): tutti gli animali sociali devono essere alloggiati in gruppi stabili di individui compatibili. Nel caso sia stato consentito l'alloggiamento singolo, la durata deve essere limitata allo stretto necessario e deve essere mantenuto il contatto visivo, uditivo e olfattivo. Inoltre deve essere sorvegliato con estrema attenzione l'inserimento o il reinserimento degli animali in gruppi stabili per evitare problemi di incompatibilità.

Allegato III sezione A

Arricchimento: Tutti gli animali dispongono di spazio sufficientemente complesso che consenta loro di esprimere un ampio repertorio di comportamenti normali. Essi dispongono di un certo grado di controllo e di scelta rispetto al proprio ambiente per ridurre comportamenti indotti da stress. Gli stabilimenti mettono in atto tecniche adeguate di arricchimento per ampliare la gamma di attività a disposizione degli animali e aumentare la loro capacità di risposta tra cui l'esercizio fisico, il foraggiamento e le attività di manipolazione e cognitive adeguate alle specie interessate. L'arricchimento ambientale offerto negli alloggiamenti è adattato alle specie e alle esigenze individuali degli animali. Le strategie di arricchimento negli stabilimenti sono riviste e aggiornate periodicamente.

Allegato III sezione A

3.4-Alimentazione: Forma, contenuto e presentazione della dieta deve rispondere alle esigenze nutrizionali e comportamentali dell'animale. Gli alimenti gustosi e non contaminati.

Imballo, trasporto e stoccaggio sono organizzati in modo da evitare la contaminazione, il deterioramento o la distruzione del prodotto.

Tutti gli animali devono poter avere la possibilità di accesso agli alimenti e avere spazio sufficiente per mangiare in modo da limitare la concorrenza tra animali.

Allegato III sezione A

3.5-Abbeveraggio

Tutti gli animali dispongono di acqua potabile non infetta

Manutenzione degli abbeveratoi automatici, controllo sulla pressione adeguata

3.6-Zone per il riposo

Devono sempre essere a disposizione materiali per lettiere o giacigli per il riposo adeguati alle specie, ivi compresi materiali per nidi o strutture per gli animali in fase di riproduzione.

All'interno degli alloggiamenti, secondo i bisogni della specie interessata, è prevista una superficie solida e comoda per il riposo di tutti gli animali.

Allegato III sezione A



3.7-Gestione

...programmi di adattamento ed addestramento adeguati agli animali, alle procedure e alla durata del progetto.

Allegato III sezione B

Nuove conoscenze scientifiche relative al benessere animale e alla loro capacità di provare/esprimere dolore, sofferenza e stress hanno determinato il progresso nella tecnologia con un'attenzione maggiore **alle esigenze degli animali** individuando nuove e più idonee caratteristiche per una stabulazione più confortevole.

In base al proprio **repertorio comportamentale (etogramma)** e quindi alle necessità comportamentali naturali, sono state individuate le caratteristiche delle gabbie più idonee per migliorare il benessere degli animali impiegati a fini sperimentali e la possibilità di manifestare i loro comportamenti specie-specifici

Allegato III sezione B

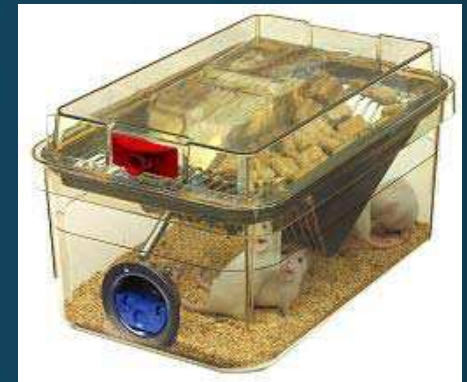
Tabella 1.1. Topi

	Peso corporeo (g)	Dimensione minima dell'alloggiamento (cm ²)	Spazio al suolo per animale (cm ²)	Altezza minima dell'alloggiamento (cm)	Data di cui all'articolo 22, comma 1
In riserva e durante le procedure	fino a 20	330	60	12	1° gennaio 2017
	> 20 fino a 25	330	70	12	
	> 25 fino a 30	330	80	12	
	oltre 30	330	100	12	
Riproduzione		330 Per una coppia monogama (non consanguinei/consanguinei) o un trio (consanguinei). Per ogni ulteriore femmina e figliata aggiungere 180 cm ²		12	
Riserva presso gli allevatori*	Dimensione alloggiamento inferiore a 20	950	40	12	
	Dimensione alloggiamento inferiore a 20	1500	30	12	

* I topi svezzati possono rimanere a queste densità di popolamento più elevate per il breve periodo dopo lo svezzamento e fino a quando

Tabella 1.2. Ratti

	Peso corporeo (g)	Dimensione minima dell'alloggiamento (cm ²)	Spazio al suolo per animale (cm ²)	Altezza minima dell'alloggiamento (cm)	Data di cui all'articolo 22, comma 1
In riserva e durante le procedure*	fino a 200	800	200	18	1° gennaio 2017
	> 200 fino a 300	800	250	18	
	> 300 fino a 400	800	350	18	
	> 400 fino a 600	800	450	18	
	oltre 600	1500	600	18	
	Riproduzione		800 Madre e figliata. Per ciascun animale adulto aggiunto all'alloggiamento in via permanente aggiungere 400 cm ²		
Riserva presso gli allevatori**	Dimensione alloggiamento inferiore a 50	1500	100	18	
	> 50 fino a 100	1500	125	18	
	> 100 fino a				





Ricezione degli animali



- ✓ Verifica del fornitore
- ✓ Verifica del documento di trasporto e che la fornitura corrisponda a quanto richiesto.
- ✓ Controllo della certificazione sanitaria
- ✓ Verificare l'integrità delle scatole e dei filtri



Health Monitoring

charles river
EUROPE SPF/IVF Barrier Room
EUROPEAN

Charles River Laboratories Italia

Health Status: **SPF / IVF**

Summary Item	Method	Primary Lab	Test Date	Passes / Failed	Passes / Failed
Viruses					
Mouse Virus of Asia (MVA) se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100
Mouse Parvovirus (MPV) se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100
Mouse Hepatitis Virus (MHV) se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100
Mouse Norovirus (MNV) se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100
Mouse Virus (MNV) of Europe se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100
Mouse Polyoma (PVO) se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100
Rotavirus 1 (RV1) se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100
Rhinovirus Virus (RHV) se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100
Mouse Poxvirus (MPOV) se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100
Mycoplasma (Mycoplasma) se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100
Mouse Pylori (MPLY) se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100
Mycoplasma (Mycoplasma) se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100
Herpes Virus (HV) se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100
Leptospira (Leptospira) se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100
Mouse Adenovirus (MAYV) se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100
Chlamydia (Chlamydia) se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100
K. pneumoniae (K. pneumoniae) se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100
Chromobacterium (Chromobacterium) se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100
Legionella (Legionella) se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100
Stenotrophomonas (Stenotrophomonas) se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100
Other Bacteria (Other Bacteria) se	MPHA	RAGS-US	14-Sep-2018	0/1	0/1 100

charles river
EUROPE SPF/IVF Barrier Room
EUROPEAN

Charles River Laboratories Italia

Health Status: **SPF / IVF**

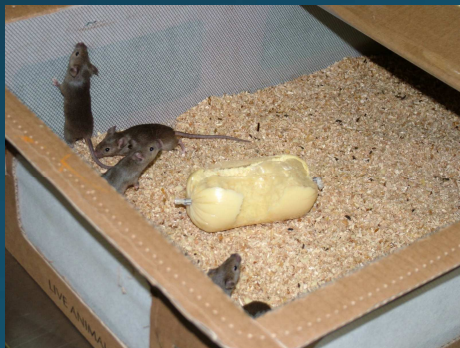
Summary Item	Method	Primary Lab	Test Date	Passes / Failed	Passes / Failed
Parasites					
Leishmaniasis se	Direct Exam	RAGS-EU	03-Jul-2018	0/1	0/1 100
Microsporidia se	Direct Exam	RAGS-EU	03-Jul-2018	0/1	0/1 100
Other Parasites (Other Parasites) se	Direct Exam	RAGS-EU	03-Jul-2018	0/1	0/1 100
Lesion Observations					
Lesion Observations (Lesion Observations) se	Exam	RAGS-EU	03-Jul-2018	0/1	0/1 100



Ricezione degli animali



- ✓ Procedere alla sanitizzazione degli imballi con nebulizzazione di soluzioni disinfettanti/detergenti prima dell'ingresso in stabulario
- ✓ Apertura degli imballi in **aree destinate al solo ricevimento animali**
- ✓ In base alla normativa alloggiare gli animali in numero adeguato nelle gabbie predisposte in base alla specie e al peso





Ricezione degli animali



- ✓ Identificare gli animali con apposito cartellino compilato e applicato alle gabbie dove devono essere riportati i seguenti dati:

Specie, ceppo, sesso, peso, età, data di arrivo, codice del progetto e/o autorizzazione ministeriale, responsabile del progetto e recapito telefonico, note

- ✓ Trasferimento nell'area dedicata alla quarantena

Centro Nazionale BENA Stabulario	
Ed... Piano... Stanza	Note.....
Esperienza N°	
Specie animale	
Ceppo	
Sesso M / F	
Data di arrivo	
Cod. Progetto	
Scadenza Progetto	
Resp. Progetto	
Tel.	



Quarantena/isolamento

Scopo della quarantena

- Recupero fisico dell'animale**: stress da trasporto, condizioni climatiche variabili, alterazione dei parametri ematobiochimici
- Valutazione del suo stato di salute e sanitario**

La quarantena può essere ottenuta non necessariamente impiegando **un'area dedicata** ma è anche possibile ottenerla con sistemi di contenimento come:

Isolatori

IVC

Armadi climatizzati

Durata della quarantena: **5-15 giorni**



Ispezione degli animali

Visita collettiva (valutazioni fisiche e osservazioni cliniche)

- vivacità** :(indice di benessere psico-fisico), animale deve essere vigile e reattivo
- stato nutrizionale**: controllo dorso, fianchi, verifica del consumo di acqua e di cibo
- Aspetto del pelo**: lucido, liscio, uniforme
- Aspetto delle feci**: solide, liquide



Ispezione degli animali

Visita individuale (ispezione, palpazione, esami collaterali)

osservare l'animale nella gabbia prima di estrarlo e verificare lo stato del sensorio e l'aspetto del pelo che deve essere lucido, uniforme e pulito. Dopo averlo estratto si esegue l'**ispezione** di testa, collo, arti anteriori, tronco, arti posteriori e coda che deve essere regolare senza ferite, ulcere e croste. Deve essere ispezionata anche la bocca con attenzione alla crescita degli incisivi. Si procede infine alla **palpazione** dell'addome e al controllo degli orifizi.



Scheda esperienza

PGSAGA01.003	SCHEDA ESPERIENZA	REV. 3
--------------	-------------------	--------

Controllo Istituzionale SI NO Esperienza nr° 783

Dip./Centro/Servizio BCM Data arrivo 6/09/07

Responsabile MARTINI Tel -

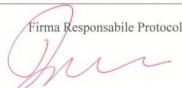
Protocollo di Ricerca -

Specie Animale TOP EDI Nr° 30 Mese SETTEM. Anno 2007

Giorno	Presenti	Morti/Soppressi	Note
1			
2			
3			
4			
5			
6	<u>30</u>		
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			<u>INOCULI I.P.</u>
15			
16			
17	<u>75</u>	<u>15</u>	
18			
19	<u>35</u>	<u>50</u>	<u>SOPPRESSI PER PRECIBUO ORGANI</u>
20			
21			
22			
23			
24	<u>0</u>	<u>35</u>	<u>SOPPRESSI PER PRECIBUO ORGANI</u>
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			

Note

Firma Responsabile Protocollo



Parametri ambientali e standardizzazione

La variabilità di una popolazione può essere di **origine genetica, microbiologica o ambientale**.

La **variabilità genetica** è controllata con adatti metodi di allevamento e selezione.

La **variabilità microbiologica** legata alla presenza di agenti patogeni o meno indesiderati quali batteri, virus e parassiti viene gestita mediante il monitoraggio sanitario degli animali e dell'ambiente.

La **variabilità ambientale in condizioni artificiali** può essere in gran parte controllata mediante standardizzazione delle tecniche di stabulazione, dei parametri ambientali, dell'alimentazione,...

Standardizzazione dei parametri ambientali

Obiettivo: individuare i parametri migliori ai fini del benessere animale e cercare di rendere minime le variazioni che possono modificare la risposta dell'animale durante l'esperimento influenzando il dato sperimentale.

Un dato sperimentale di qualità deve essere **affidabile, riproducibile e traslabile**.

La mancanza del rispetto dei requisiti ambientali, oltre che venire meno al processo di standardizzazione, può **influenzare il comportamento fisiologico degli animali, causare problematiche di tipo respiratorio e aumentare la suscettibilità alle malattie** (Baer et al., 1997; Broderson et al., 1976; Memarzadeh et al., 2004; Schoeb et al., 1982; Vesell et al., 1976).

Micro e macro-ambiente

Microambiente:

L'ambiente chimico-fisico che circonda l'animale e con cui è direttamente a contatto e che ha determinate caratteristiche di temperatura, umidità, ventilazione, l'illuminazione.



Micro e macro-ambiente

Macroambiente:

Ambiente chimico-fisico dove sono alloggiate le gabbie che è rappresentato dai **locali di permanenza, dagli ambienti dedicati alle procedure, dai laboratori**, caratterizzati da determinati valori di temperatura, umidità, illuminazione, rumori, polveri, gas, vapori e ricambi d'aria.



Microambiente

Il **microambiente** è influenzato da:

- Dal tipo di gabbia (gabbie convenzionali, filter-top, IVC, armadi)
- la posizione della gabbia nel rack o nel locale
- il sistema di ventilazione
- la densità della popolazione
- la frequenza del cambio lettiera
- il tipo di lettiera
- Illuminazione
- la dieta
- l'acqua



Gabbie a ventilazione individuale (IVC)



- la presenza di filtri HEPA in entrata e in uscita consente un alto grado di protezione microbiologica sia per gli animali che per l'ambiente
- consente di **ottimizzare le condizioni del microambiente, con bassi livelli di NH₃ e di CO₂** e rendendo possibile il cambio della lettiera ogni **due settimane** invece che settimanalmente con risvolti positivi sul benessere animale.
- protegge il personale dagli **allergeni** e da **animali infetti (biocontenimento)**
- ideale per stabulare animali **immunodepressi, transgenici e colonie infette**
- consente la stabulazione di **gruppi sperimentali diversi**

Temperatura e umidità

Topo

Temperatura 20-24°C

Umidità relativa (%) 50-60

Ventilazione (ricambi/h) 15

Luce/buio (h) 12/12-14/10

Coniglio

Temperatura 15-21°C

Umidità relativa (%) 50-60

Ventilazione (ricambi/h) 15

Luce/buio (h) 12/12

Ratto

Temperatura 20-24°C

Umidità relativa (%) 50-60

Ventilazione (ricambi/h) 15

Luce/buio (h) 12/12-14/10

Cavia

Temperatura 20-24°C

Umidità relativa (%) 50-60

Ventilazione (ricambi/h) 15

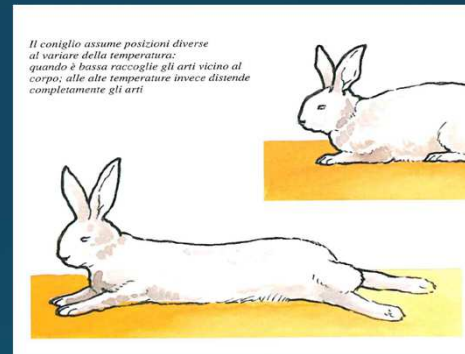
Luce/buio (h) 12/12

Temperatura e umidità

Termoregolazione



Temperature inferiori a 15 °C



Temperature superiori a 21 °C

Alle alte temperature può assumere particolari posizioni (allungarsi completamente su una superficie fresca), variare la frequenza respiratoria, variare l'irrorazione delle estremità corporee, soprattutto le orecchie (12% della superficie corporea) che diventano arrossate e vengono portate lateralmente per facilitare la dispersione di calore. Per temperature inferiori ai 15 °C il coniglio si rannicchia portando arti e orecchie il più possibile vicino al corpo.

Temperatura e umidità

Aumento di temperatura ed umidità

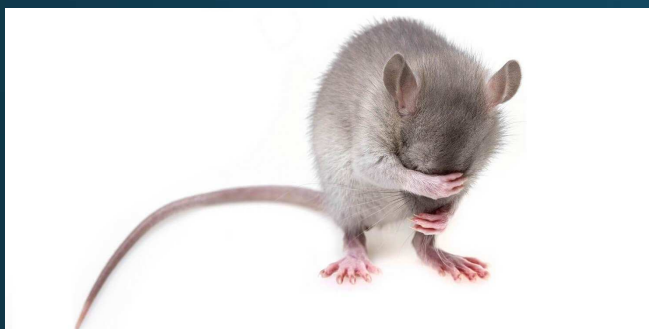
- riduzione del consumo di cibo e quindi del peso corporeo
- aumento del consumo di acqua
- aborto
- calo frequenza accoppiamenti
- aumento della suscettibilità alle infezioni per aumento della concentrazione di ammoniaca

Diminuzione di temperatura ed umidità

- aumentano la presenza di polveri
- causano secchezza e irritazione delle vie aeree
- ring-tail spt nel ratto (coda ad anelli) con lacerazioni e desquamazione della coda
- problematiche riproduttive

Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits, Fourth Edition, Stephen W Barthold, Stephen M Griffey, 2016





Illuminazione

Quasi tutti gli animali da laboratorio hanno **abitudini crepuscolari o notturne** e quindi risultano particolarmente sensibili all'esposizione ad elevate intensità luminose. I danni retinici degli albini sono spesso dovuti ad una esposizione prolungata ad una intensità luminosa non ottimale. I **cicli luce/buio** devono essere mantenuti in **12h/12h** oppure **14h/10h**. Per ottenere una buona standardizzazione è necessario **evitare la luce naturale**, utilizzare **lampade a fluorescenza** che hanno uno **spettro luminoso** più simile a quello della luce naturale e una **intensità luminosa di 300-400 lux** (misurata sotto la **sorgente luminosa ad un metro di altezza dal pavimento**). Per gli animali albini l'intensità luminosa della stanza non deve superare i 60 lux.

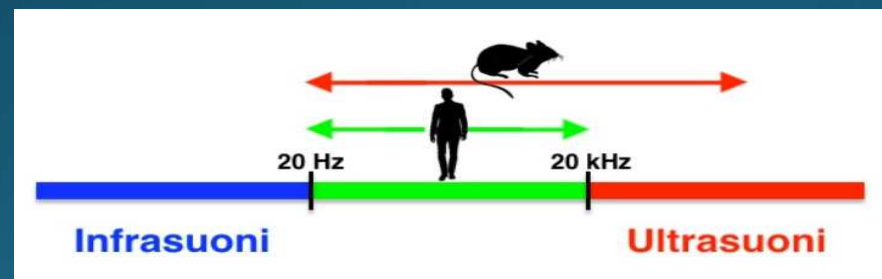
Ventilazione

La ventilazione di una determinata area rappresenta la capacità di sostituire l'aria confinata mediante introduzione di aria fresca con il fine di mantenere basso il livello di gas, polveri ed agenti infettivi presenti. Essa viene misurata in termini di ricambi d'aria effettuati dall'impianto di condizionamento ogni ora.

- il numero ottimale è di **10-15 ricambi d'aria ogni ora**
- Può essere impiegata una frequenza minore se il numero degli animali in rapporto alle dimensioni della stanza è basso ma mai scendere sotto gli **8-10 ricambi d'aria per ora**.
- L'immissione dell'aria nelle stanze dovrebbe essere regolata da appositi sistemi in grado di evitare la formazione di **correnti d'aria rivolte direttamente agli animali**
- Pressione positiva (**bioesclusione**) o negativa (**biocontenimento**) all'interno della stanza a seconda delle necessità sperimentali e di **contenimento degli agenti biologici impiegati**.
- Pulizia mensile dei filtri

Rumore

I piccoli roditori hanno una capacità uditiva più sviluppata rispetto all'uomo, **fino a 80 kHz nel ratto**. Oltre a rappresentare un enorme fonte di stress possono causare anche danni di tipo anatomico-funzionale. I suoni più dannosi sono **suoni inaspettati forti e non familiari** come ad esempio: cellulari, allarmi, sorgenti che generano ultrasuoni come monitor, lavagabbie, acqua corrente, carrelli che cigolano, porte che sbattono, agitatori. **Possono essere responsabili di effetti sulla formula leucocitaria, sulla perdita di peso, sulla pressione arteriosa, sulla glicemia, e sui cicli estrali**. Il livello raccomandato di intensità del suono deve essere inferiore a 60 dB.



Caratteristiche della lettiera

- Elevato assorbimento urine
- Capacità di trattenere odori naturali
- Basso contenuto in polveri
- Voluminosità
- Garantisce isolamento termico
- Priva di residui antiparassitari
- Presenza di contaminanti chimici e microbiologici nei range consentiti
- Atraumatica
- Aumento della riproduttività
- Atossica

Truciolo di pioppo, truciolo di abete, quadruccio di pioppo, sfogliato di abete, tutolo di mais,...etc





Truciolo di abete



Tutolo di mais

Olfatto

L'olfatto è un senso particolarmente sviluppato nei roditori e la corteccia olfattoria interessa una porzione ampia della corteccia sensoriale.

Le "tracce" olfattive (urinarie, fecali e ghiandolari) rappresentano componenti importanti nel comportamento sociale, sessuale e parentale e comunicano il grado di parentela, lo stato di salute, la dominanza e gli stati di paura.

Gli odori sono importanti per creare un ambiente familiare e sicuro e la loro rimozione (cambio gabbie) può portare ad una condizione di stress e aumentare i comportamenti aggressivi nei topi molto più che nei ratti

Impiego di **disinfettanti inodori**

Dieta

Pellets di dimensioni diverse che costringono gli animali a mangiare tutto.

La compressione abbassa la carica batterica conferendo maggiore durezza che aiuta a limare/consumare i denti

Diete standard per topi con 20-27 % di proteine e il 3 % di grassi.

Valori maggiori di proteine influiscono negativamente sull'attività riproduttiva

Diete ricche di grassi sono meno resistenti a condizioni di temperatura e luce inadeguate.

Diete trattate con il calore con un contenuto maggiore in vitamine perché termolabili.

Esistono in commercio diete di mantenimento, per gestanti, per lo svezzamento, ipercaloriche, obesogene, iperglicemiche, ipoglicemiche, medicate. la scelta di una dieta appropriata può influenzare vari aspetti tra cui una riduzione dell'attività riproduttiva, complicanze al parto, comportamenti aberranti delle madri con cannibalismo della prole e/o abbandono delle nidiate.

Manipolazione e contenimento

- La **tecnica**
- Contenimento **certo, rapido e sicuro**
- Immobilità dell'animale
- Dosare la forza

Inoltre, una scorretta manipolazione può anche essere **causa di errori nella somministrazione** con conseguenze importanti :

- Un Gavage eseguito non correttamente può causare polmonite ab-ingestis, perforazione dell'esofago, soffocamento
- Una non corretta somministrazione EV può causare dolore, reazioni infiammatorie e necrosi nel punto di inoculo

Manipolazione e contenimento

Osservare la risposta dell'animale all'approccio e dopo che l'animale è stato rilasciato nel suo ambiente fornisce utili informazioni.

Se gli animali cercano di sfuggire allontanandosi dall'operatore, oppongono resistenza alla ricattura, tentano di nascondersi



animali stressati

Se gli animali sono curiosi e si avvicinano volontariamente all'operatore fino al contatto cercando di interagire



risposta positiva alla manipolazione

Tecnica di presa dalla coda

Una tecnica per la presa del topo consiste nell'afferrare delicatamente, con pollice ed indice, **la base della coda del topo** poiché **la punta** spesso non è in grado di sopportare il peso e si corre il rischio di provocare un danno all'animale soprattutto nel ratto.



Tecnica di presa con forcipe



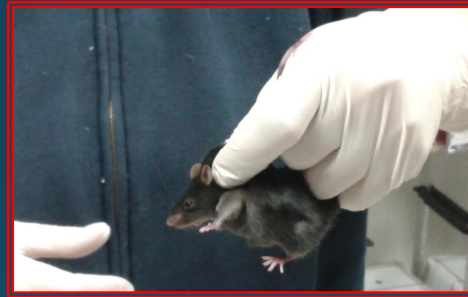
1-Tecnica di immobilizzazione con una mano



L'immobilizzazione completa dell'animale si ottiene afferrando il topo per la base della coda. Successivamente deve essere avvicinato alla griglia della gabbia in modo da permettergli di aggrapparsi con gli arti anteriori e posteriori. Solitamente questa fase viene eseguita con la mano non dominante.

Successivamente viene bloccata la base della coda tra il mignolo e l'anulare.

1-Tecnica di immobilizzazione con una mano

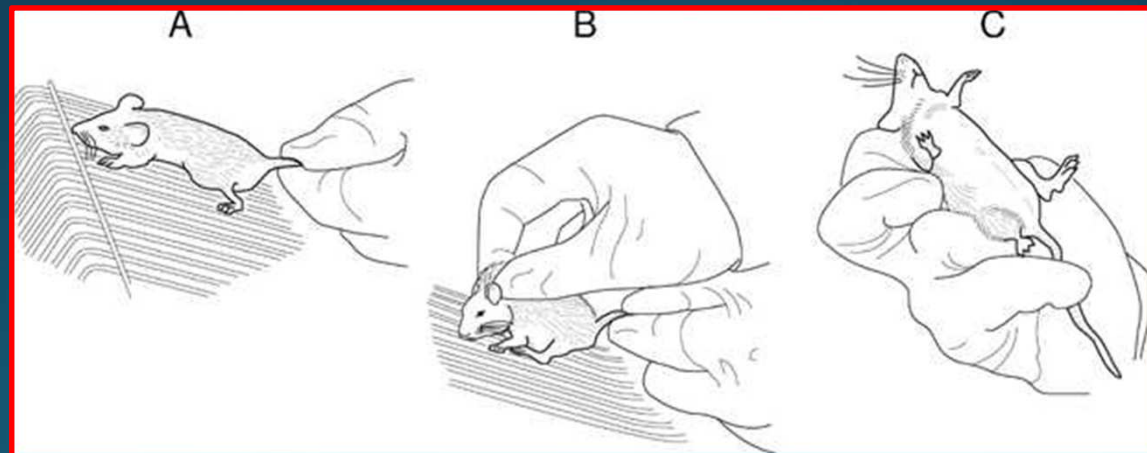


viene presa una plica cutanea dorsale del collo, alla base della testa, tra pollice e indice della stessa mano che tiene la coda

Questa tecnica, utile soprattutto con soggetti molto aggressivi o quando è necessario eseguire medicazioni, ispezioni sul corpo dell'animale o **piccole procedure che non richiedono particolare precisione** perché permette di immobilizzare l'animale con una sola mano lasciando quindi libera l'altra ma la presa a volte può non essere precisa.

2-Tecnica di immobilizzazione con una mano

Altra tecnica di immobilizzazione con una mano impiegando entrambe le mani durante la procedura. L'immobilizzazione completa dell'animale si ottiene afferrando il topo per la base della coda con la mano dominante e lo si avvicina alle maglie della gabbia in modo da permettergli di aggrapparsi con gli arti. Viene presa una plica cutanea dorsale del collo tra pollice e indice della mano opposta e si posiziona la coda tra le restanti tre dita ed il palmo della stessa mano.



Tecnica di immobilizzazione a due mani

Altra tecnica simile alla precedente che prevede l'uso di due mani: si afferra il topo alla base della coda con l'indice e il pollice di una mano e si solleva la plica cutanea del collo con l'indice e il pollice dell'altra mano.





Cambio della gabbia



Abituare il topo ad essere manipolato e favorire un **approccio volontario** del topo all'operatore determina una maggiore predisposizione alla presa fisica.

Il training può essere fatto durante il **periodo di acclimatazione** prima di essere utilizzati in una procedura di ricerca e **l'abitudine a questo tipo di contenzione** iniziale **persiste** anche quando i topi vengono successivamente manipolati in modo più sicuro, con le prese standard per consentire l'esecuzione di iniezioni.

Un animale tranquillo e fidato può essere sollevato semplicemente mettendo le **mani a cucchiaino o utilizzando un tunnel**. Questa tecnica risulta essere utile soprattutto quando gli animali si mostrano particolarmente **nervosi/irritabili**.

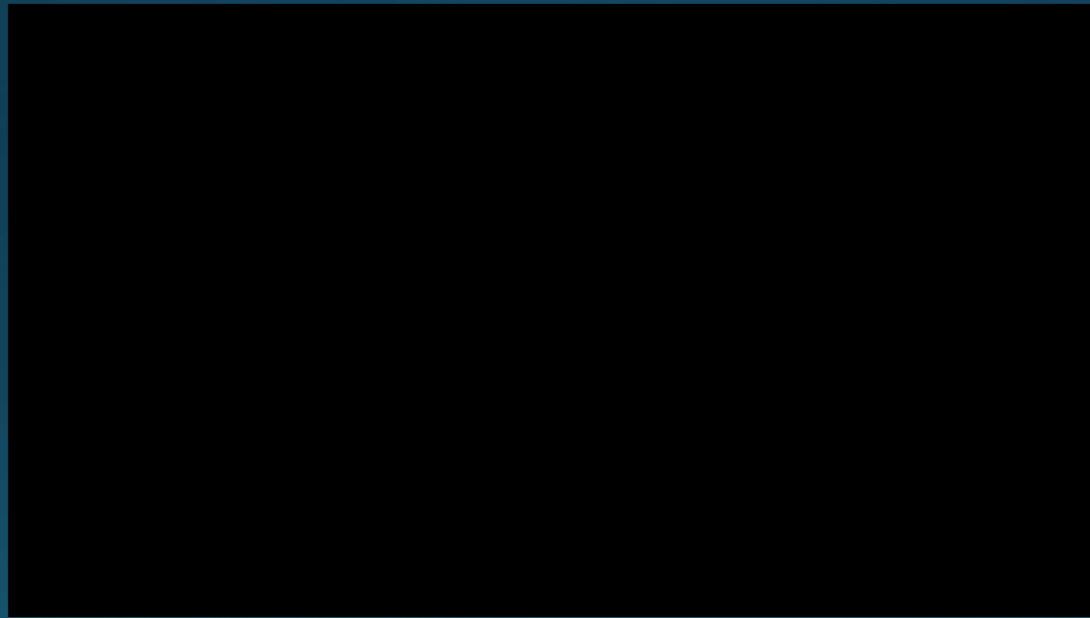
Sostituire la presa dei topi attraverso la coda con sistemi alternativi, oltre che rappresentare un **arricchimento** è un **momento di interazione**, serve a minimizzare lo stress dell'animale.



Taming anxiety in laboratory mice. Nat Methods. 2010 Oct;7(10):825-6.
Hurst JL¹, West RS.



Cambio della gabbia con tunnel

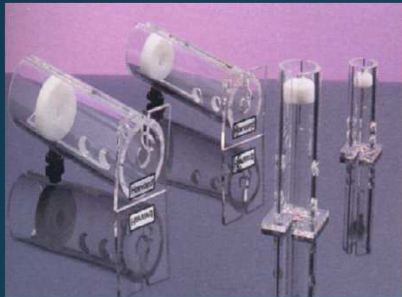


Altra tecnica...



<https://www.nc3rs.org.uk/how-to-pick-up-a-mouse>

Sistemi di contenimento

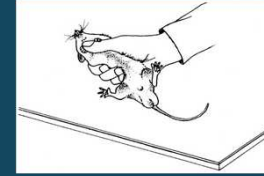
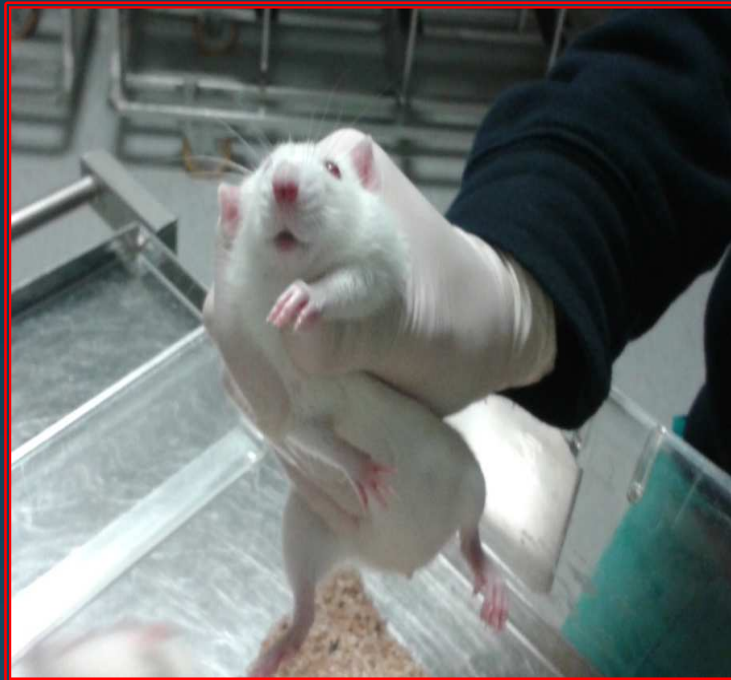
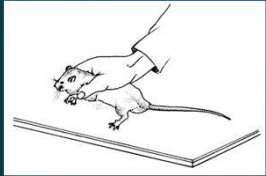


Manipolazione e contenimento



Il ratto apprezza di più rispetto al topo l'interazione uomo-animale. Passare qualche minuto a socializzare con il ratto prima della presa lo renderà più predisposto alla cooperazione.

Tecnica di presa

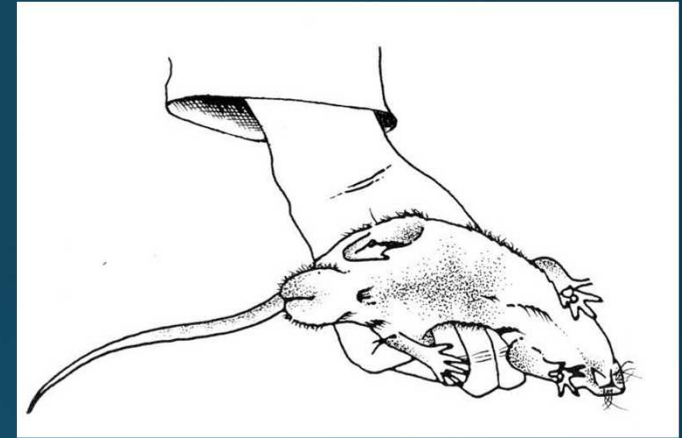
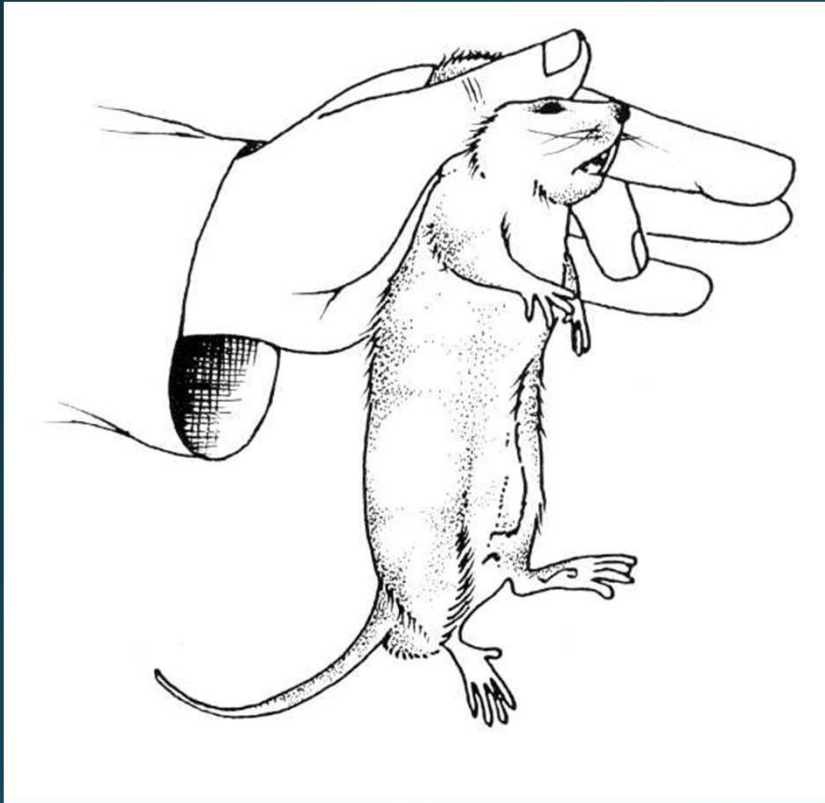


Per una presa corretta bisogna afferrare il ratto nella parte alta del corpo con il pollice e l'indice subito sotto gli arti anteriori. Successivamente il pollice va fatto scivolare sotto il mento dell'animale per bloccare la testa.

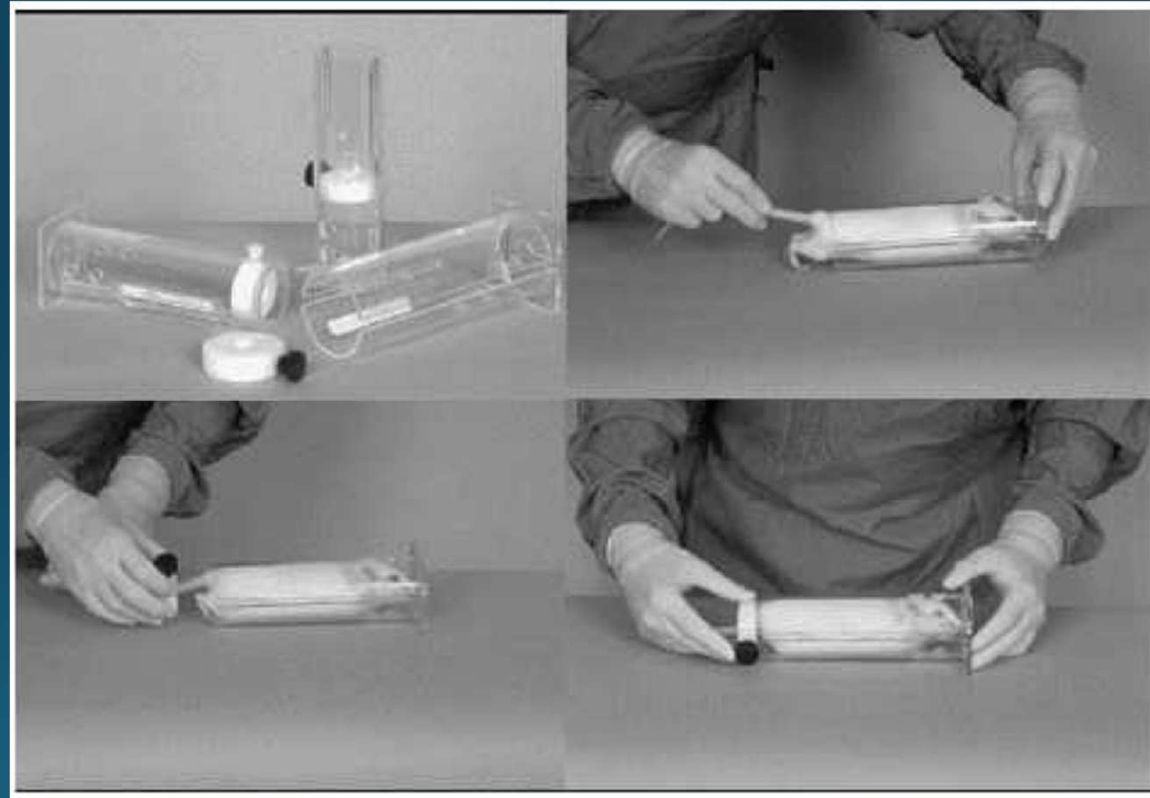




Tecnica di immobilizzazione



Sistemi di contenimento



Manipolazione e contenimento

HOW TO REMOVE A RABBIT FROM A CAGE

Approach the cage and open the door slowly so that you will not startle the rabbit. Reach in and grip the loose skin over the shoulders firmly but gently with your left hand. Place your right hand under the rabbit's rump to support its weight.

NOTE: The right hand may be opened and placed flat under the rabbit's stomach instead of under the rump, but this requires more skill. NEVER use the flat-handed method for handling pregnant does. It might injure the unborn young.

Lift the rabbit out of the cage.

HOW TO CARRY A RABBIT

Grasp the loose skin over the neck with your left hand and place your right hand under the animal's rump, as you did in removing the rabbit from its cage.

Pick up the rabbit and hold it in an upright position.

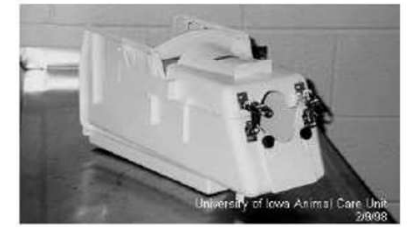
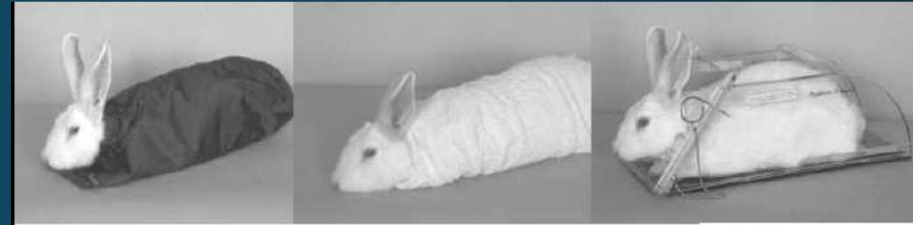
CAUTION: Never lift or carry a rabbit by its ears. They aren't handles! Don't carry a rabbit by the neck skin alone. This is painful to the animal and will cause it to struggle. You run the chance of getting scratched by the sharp rear claws.

Carry the rabbit out in front of yourself.



Il coniglio presenta un apparato muscolare possente e uno scheletro fragile che rappresenta solo l'8% del peso corporeo. Le ossa lunghe e quelle della regione lombare sono particolarmente predisposte alla frattura. Per questo motivo è richiesta una contenzione idonea dell'animale.

Sistemi di contenimento



Manipolazione e contenimento

HOW TO PICK UP A GUINEA PIG

Approach the animal in a quiet, confident manner. Place one hand across the shoulders. Place your thumb behind the front legs and the fingers well forward on the opposite side.

NOTE: Do not apply excessive pressure to the animal's body. You can hurt the guinea pig and cause it to squirm needlessly.

Pick up the animal and hold it in an upright position.



HOW TO CARRY A GUINEA PIG

Pick up the guinea pig. Place your free hand palm uppermost under the hindquarters to support the animal's weight. If it struggles, hold the hind legs to get a more secure grip.

HOW TO HOLD A GUINEA PIG FOR INJECTIONS

Grasp and extend the hind limbs with your free hand. This will enable the investigator to inject the animal in the midsection.



È consigliabile afferrare l'animale al garrese e sostenerlo con l'altra mano

Arricchimento

“un metodo per migliorare il benessere animale fornendo agli animali stimoli sensoriali e motori, attraverso strutture e risorse che facilitano l'espressione di comportamenti tipici della specie e promuovono il benessere psicologico attraverso l'esercizio fisico, le attività di manipolazione e le sfide cognitive in accordo con le caratteristiche specie-specifiche” *Care and Use of Laboratory Animal (2011)*



Arricchimento

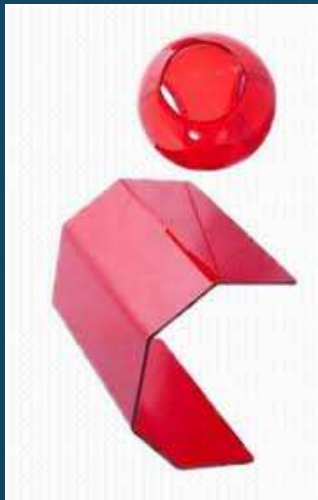
Le **condizioni standard** di stabulazione forniscono un **ambiente limitato** rispetto a quello naturale che si presenta molto **più complesso e ricco di stimoli**. Un ambiente **sterile**, che non tiene in considerazione il comportamento naturale dell'animale, può portare ad **alterazioni nello sviluppo, nella fisiologia e nel comportamento**.

Nasce quindi la necessità di rendere il **microambiente stimolante** favorendo **comportamenti naturali innati**.

Categorie di comportamento

- Interazione sociale
- Masticazione/rosicchiare
- Toelettatura
- Locomozione (scalare, esplorare, giocare, scavare)
- Nidificare, riposare, nascondersi
- Manipolare, trasportare, accaparrarsi il cibo e gli oggetti





Arricchimento

Alcuni autori lo hanno suddiviso in:

- Sociale diretto o indiretto**: tra conspecifici o altre specie tra cui l'uomo, è un tipo di arricchimento **complesso, nuovo e stimolante**
- Occupazionale**: stimola quei comportamenti che normalmente in natura impegnano gli animali ad investire **gran parte del loro tempo** come la costruzione del nido, materiale da rosicchiare come bastoncini o tronchetti di legno
- Fisico o strutturale**: aumento della complessità della gabbia con rifugi, tunnel, ruote
- Sensoriale**: visivo, olfattivo, tattile
- Nutrizionale**: semi e grano sono molto graditi come anche pellets aromatizzati e gelatine a base di zucchero.

Arricchimento

L'obiettivo non è solo quello di **promuovere un comportamento normale** ma anche quello di **ridurre i comportamenti anormali**, come **le stereotipie** (comportamenti ripetitivi causati dalla noia, la frustrazione o da disfunzioni del SNC), **l'eccessiva aggressività** e i **danni autoinflitti**.

L'arricchimento che si decide di introdurre deve essere qualcosa di **etologicamente significativo**.

Quindi solamente dopo aver eseguito una attenta valutazione comportamentale della specie in questione viene scelto quale comportamento privilegiare e con quale mezzo. **La scelta dell'arricchimento può variare anche in base alla specie e al ceppo.**

Scelta dell'arricchimento

- analisi del comportamento (etogramma)**: elenco di comportamenti e il tempo che l'animale impiega per le differenti attività
- test di preferenza**: scelta tra due o più ambienti, gabbia standard versus gabbia arricchita o due tipi di arricchimenti. **La preferenza che esprime l'animale è un'indicazione importante da tenere in considerazione.**
- test di motivazione**: l'animale sceglie pagando un prezzo, come per esempio sollevare una barriera fisica pesante per avere accesso a qualcosa che desidera.

Una volta individuato l'arricchimento giusto in grado di migliorare il benessere dell'animale bisogna considerare **il danno fisico** e il **possibile impatto sui dati sperimentali** (per es. topi nudi atimici arricchiti con materiale a base di cotone-congiuntivite dopo due settimane di esposizione perché animali senza ciglia; l'impiego di carta velina in topi balb/c impiegati per studi sull'asma allergica hanno falsato i dati sperimentali aumentando il numero degli eosinofili).

NON UTILIZZARE FORME DI ARRICCHIMENTO IN MODO CASUALE !

Arricchimenti

Il più semplice arricchimento è rappresentato dal **materiale per la costruzione del nido**. Favorisce un comportamento naturale, innato, che coinvolge sia il maschio che la femmina e l'abilità nella costruzione del nido è legata alla temperatura ambientale, all'attività riproduttiva e a fattori genetici.

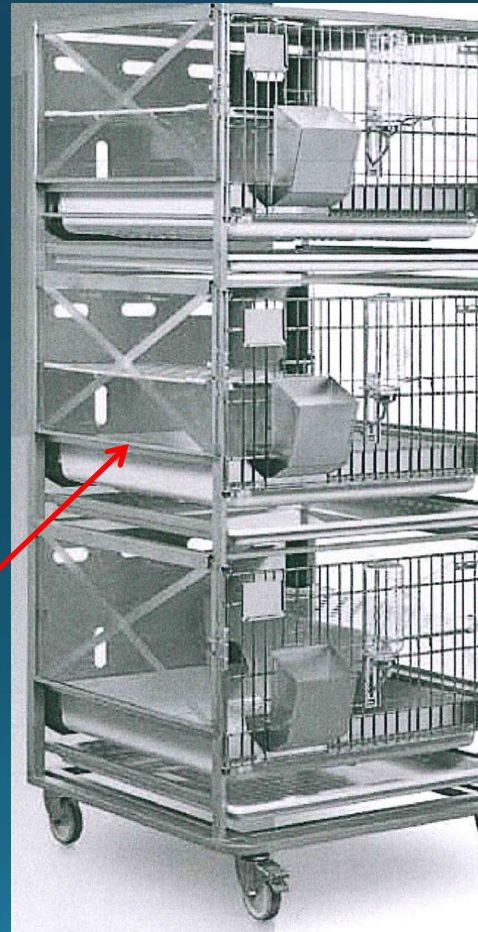
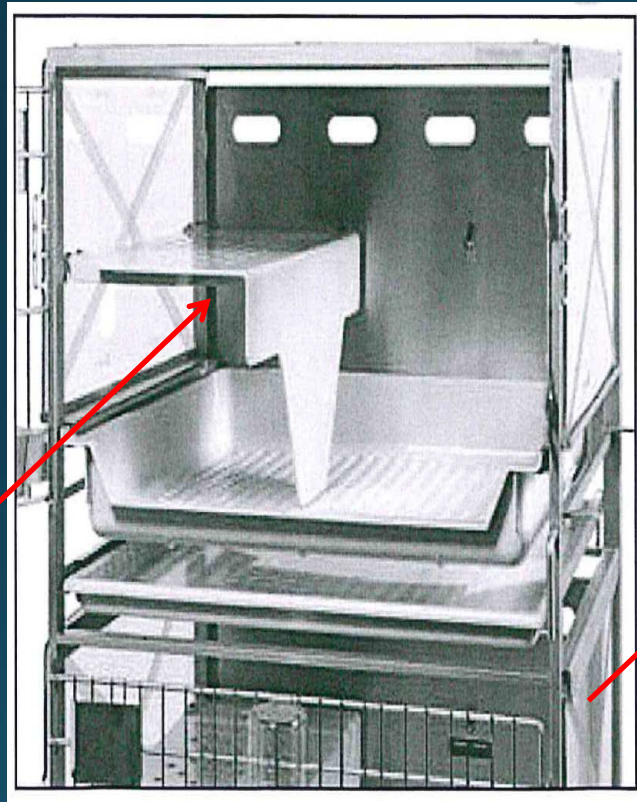
Il tempo impiegato nella costruzione del nido e la capacità di strutturarlo adeguatamente (integrare materiali differenti) rappresentano dei validi indicatori di benessere dell'animale

Bedding Bag

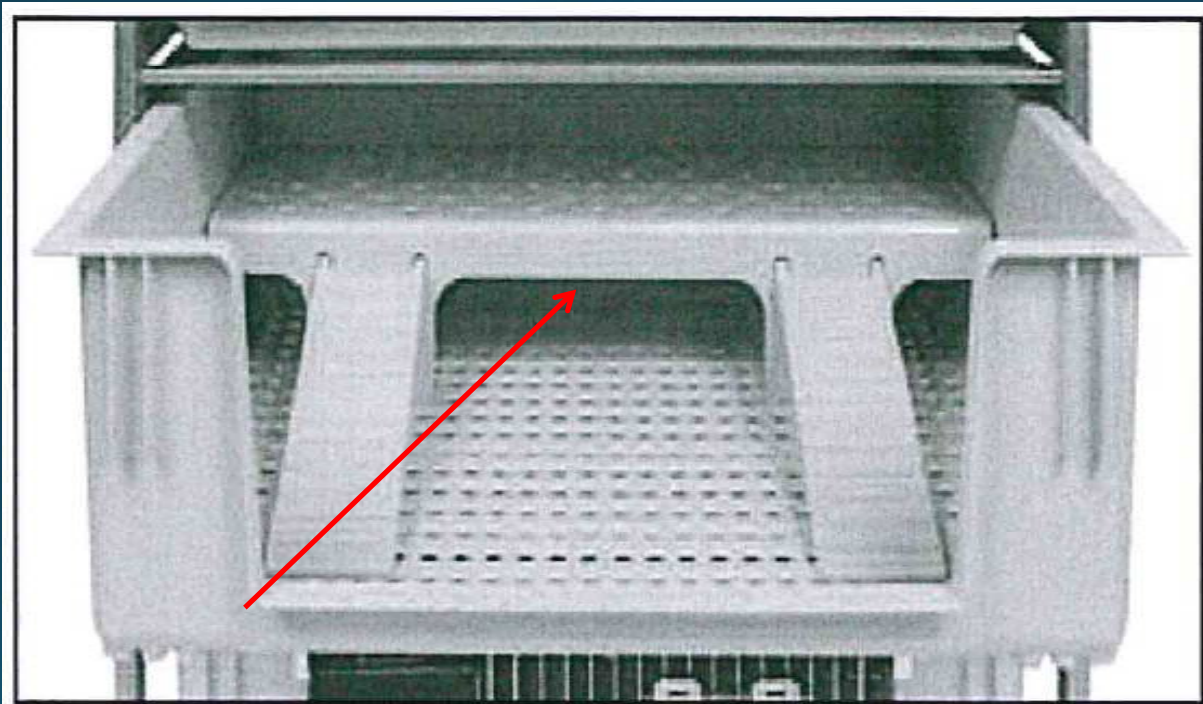


Il **bedding bag** è realizzato con un imballaggio di tessuto no tessuto di cellulosa e contiene lettiera predosata. Oltre ad essere economico e di facile impiego riesce a mantenere impegnati i roditori stessi nell'apertura della confezione e nella distribuzione del prodotto all'interno della gabbia secondo le loro necessità.

Arricchimento per conigli



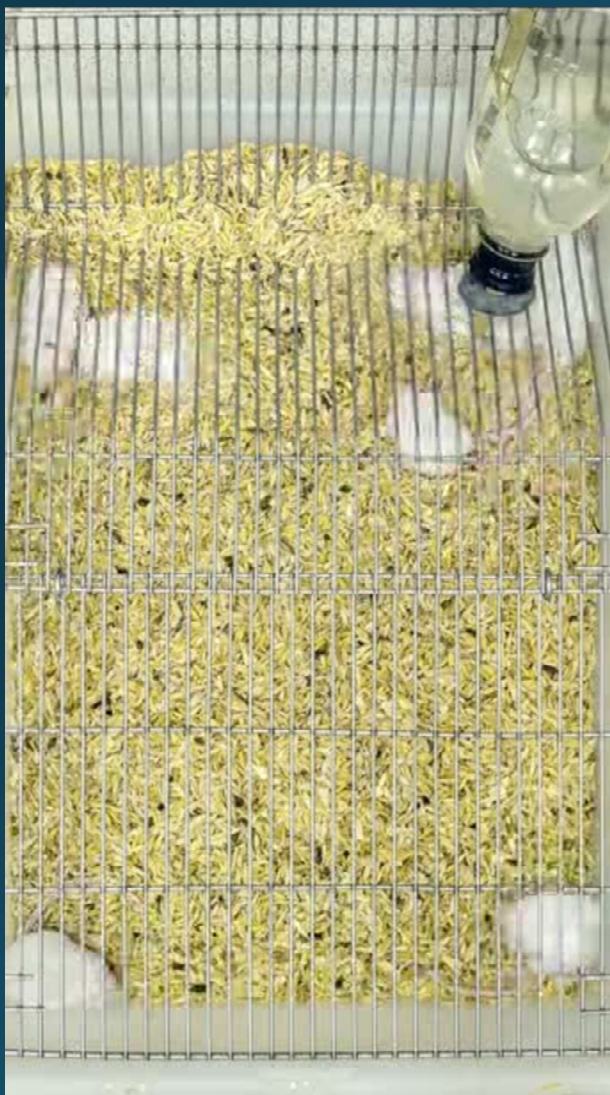
Arricchimento per cavie



Environmental enrichment

Arricchimento





Uno spazio maggiore, se non strutturato **non** costituisce un arricchimento ambientale

Arricchimento

uno spazio, anche se piccolo, ma ben organizzato..., **Si!!**



Attenzione

L'impiego dell'arricchimento può destare preoccupazione legate al fatto che l'uso di differenti arricchimenti possa **introdurre delle variabili** (differenti repertori comportamentali e variazioni delle risposte ai trattamenti sperimentali) **riducendo la standardizzazione** fra le diverse realtà di laboratorio così come anche la precisione e **la riproducibilità dei dati sperimentali**.

Tuttavia anche le **condizioni di stabulazione standard** non possono essere considerate particolarmente standardizzate visto le differenze nelle tipologie di gabbie, di materiali, procedure di stabulazione in uso fra laboratori differenti.

Inoltre, **gli animali in condizioni abitative arricchite** sono da considerarsi psicologicamente e fisiologicamente più stabili e di conseguenza possono rappresentare dei **modelli più idonei** in grado di fornire **risultati più affidabili**.

Obiettivo del monitoraggio

Riconoscere situazioni nelle quali l'animale sta sperimentando momenti di dolore, sofferenza e distress

Ad oggi non esiste un sistema oggettivamente **valido e condiviso** in grado di riconoscere il dolore e la sua gravità negli animali in modo affidabile ed è ancora più incerta la valutazione di un **dolore diverso da quello reale, inteso come dolore fisico**, rappresentato da un **disagio psicologico** che influisce anch'esso negativamente sul benessere degli animali.

Monitoraggio

Durante tutto il periodo di permanenza deve essere prevista l'osservazione e il **monitoraggio del benessere** di ogni singolo animale **attraverso controlli giornalieri di routine da personale qualificato (Art. 22, comma 1 e 3 D.Lgs. 26/2014).**

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

ASPETTO
FUNZIONI CORPOREE
AMBIENTE
COMPORAMENTI
INDICATORI SPECIFICI RELATIVI
ALLA PROCEDURA
OSSERVAZIONI LIBERE

Devono essere previsti tutti gli effetti avversi possibili, gli indicatori generali e quelli specifici con i relativi punteggi definendo chiaramente i punti di intervento compresi gli humane endpoint

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

Difficoltà

La capacità di riconoscere un'alterazione del benessere dipende fortemente dalla **conoscenza e dall'esperienza dell'osservatore**, poiché topi e ratti sono animali da **preda naturali**, sono noti per sopprimere il comportamento che segnala dolore e malattia, per ridurre la possibilità di predazione. Inoltre la maggior parte di animali da laboratorio essendo **specie notturne**, a meno che non ci sia l'inversione del giorno/notte, durante il giorno, periodo nel quale viene eseguito il monitoraggio, gli animali potrebbero non manifestare alterazioni in quanto stanno riposando. Inoltre, la **stabilizzazione avviene spesso in piccoli gruppi** e questo può rendere difficile l'osservazione anche di piccoli cambiamenti nel comportamento di un singolo animale. Infine esiste un **impedimento oggettivo** rappresentato dalle gabbie di plastica e la loro disposizione su grossi scaffali che rendono difficile una valutazione senza spostare la gabbia e creare disturbo.



Livello di attenzione maggiore

- Fasi critiche dell'esperimento durante le quali il benessere dell'animale può essere minacciato
- Animali con segni di dolore, malessere, eventi avversi non previsti
- Progetti con soglie di sofferenza "grave"

È OBBLIGATORIO AUMENTARE LA FREQUENZA E L'ATTENZIONE DEL MONITORAGGIO!!!

Osservazione indisturbata

- Gli animali vengono osservati a distanza con il minor disturbo possibile.
- L'osservatore dovrebbe entrare nella stanza degli animali il più silenziosamente possibile e attendere qualche minuto prima di iniziare le osservazioni.
- In alternativa può essere impiegata una telecamera installata nella stanza per osservare gli animali in modo del tutto indisturbato e le immagini visualizzate in un'altra postazione.
- Meglio se condotta da una o poche persone per migliorare l'attendibilità e permettere di seguire la progressione delle condizioni dell'animale in modo più attento. Gli animali sono capaci di riconoscere le persone e beneficiano dal contatto familiare rispetto ad uno estraneo.



Osservazione indisturbata

Interazioni sociali positive: il gioco, la dominanza, il riposo, allo-grooming.

Interazioni sociali negative: combattimenti, isolamento, barbering.

Comportamenti anomali: irrequietezza, circling, stereotipie, letargia, vocalizzazioni, cannibalismo, riluttanza al movimento.

Osservazione dell'aspetto: presenza di malformazioni, sviluppo anormale, ritardo della crescita, piloerezione, secrezione di porfirina dagli occhi/naso del ratto (cromodacriorrea).



Un **animale sano** si presenta vigile, curioso e attento alla cura del corpo.




Ispezione visiva della stanza

Osservazione dell'ambiente e delle sue condizioni igienico-sanitarie, il rapporto luce/buio, le condizioni di temperatura e umidità, la presenza di rumori.


Osservazione ravvicinata

Prima di aprire la gabbia: Si osserva l'interno della gabbia, l'aspetto della lettiera, le condizioni del beverino e della griglia, la presenza/consumo di acqua e cibo, la presenza del nido e quanto questo sia strutturato, la presenza di feci anormali, la presenza di sangue.

Grimace Scale



**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 measure of assessing pain in rabbits.


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

The action units should only be used to assess 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 <small>• Closing of the eyelid (sweaming of orbital area) • A wrinkle may be visible around the eye</small>			
Cheek flattening <small>• Flattening of the cheeks. When obviously present, cheeks have a certain look. • The face becomes more angular and less rounded</small>			
Nose/lip shape <small>• Nose/lip (noses) are drawn vertically forming a "V" rather than "U" shape • Nose lip is inward drawn towards the chin</small>			
Whisker shape and position <small>• Whiskers are pulled 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 curve downwards</small>			
Ear shape and position <small>• Ears become more tightly folded / curled inwards or flattened 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</small>			

Read the original paper: [Smith BJ, Thomas AJ, Nicholson LC \(2015\) Evaluation of facial expressions for assessing pain during surgery in rabbits \(Capreolus capreolus\): behavioural and facial expression responses. PLoS ONE 10\(7\): e0141917. doi:10.1371/journal.pone.0141917](#)

For general information about the Rabbit Grimace Scale, visit www.rabbitgrimacescale.com



**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 measure 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 to assess 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 <small>• Closing of the eyelid (sweaming of orbital area) • A wrinkle may be visible around the eye</small>		
Nose bulge <small>• Bulging on the bridge of the nose • Vertical wrinkles on the side of the nose</small>			
Cheek bulge <small>• Bulging of the cheeks</small>			
Ear position <small>• Ears rotate outwards and/or backwards, away from the face • Ears may fold to form a 'jockey' shape • Space between the ears increases</small>			
Whisker change <small>• Whiskers are either pulled back against the chest, or pulled forward to 'stand on end' • Whiskers may clump together • Whiskers lose their natural 'downward' curve</small>			

Read the original paper: [Lloyd J, Bailey SL, Charles JA, Clarke RC, Diamond TG, Eickbush SJ, et al. \(2013\) Mouse Grimace Scale \(M-GS\) for pain assessment in mice. PLoS ONE 8\(4\): e60762. doi:10.1371/journal.pone.0060762](#)

For guidelines on using the Mouse Grimace Scale, research papers that describe this technique and for general information about the Mouse Grimace Scale, visit www.mousegrimacescale.com



**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 measure 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 to assess 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 <small>• Closing of the eyelid (sweaming of orbital area) • A wrinkle may be visible around the eye</small>		
Nose/cheek flattening <small>• Flattening and elongation of the bridge of the nose • Flattening of the cheeks (spontaneously and not touch)</small>			
Ear changes <small>• Ears fold inward and are angled forward to form a 'jockey' shape • Space between the ears increases</small>			
Whisker change <small>• Whiskers stiffen and angle along the face • Whiskers may 'clump' together • Whiskers lose their natural 'downward' curve</small>			

Read the original paper: [Sullivan RM, Wang SQ, Clanton A, Turkle AI, Velez MG, Mappin B, et al. \(2012\) The Rat Grimace Scale \(R-GS\) for pain assessment in rats. PLoS ONE 7\(12\): e44892. doi:10.1371/journal.pone.0044892](#)

For guidelines on using the Rat Grimace Scale, research papers that describe this technique and for general information about the Rat Grimace Scale, visit www.ratgrimacescale.com

Osservazione e risposta alla manipolazione

Possono essere valutate la perdita di peso, la disidratazione, ipotermia, presenza e estensione di tumori, colore delle mucose, lunghezza dei denti, **caratteristica dell'interazione (si valuta se l'animale risponde in modo normale o con dei comportamenti eccessivi)**. Le risposte che possono essere evocate durante la manipolazione includono: vocalizzazione, aggressione, ridotta tolleranza alla manipolazione, letargia o debolezza.



Risposta a stimoli esterni

Un animale allarmato da **stimoli ambientali** mostrerà il comportamento di «**congelamento**» che si alternerà ad una **postura vigile**. Entrambi i comportamenti spariranno quando l'animale si sentirà nuovamente a suo agio.

Risposta al rumore

I roditori sono sensibili ai rumori improvvisi soprattutto nell'intervallo delle alte frequenze. Questa sensibilità può essere ridotta riproducendo musica di sottofondo. La reazione al suono può essere testata facendo un rumore improvviso, come un battito di mani sopra la gabbia. Un animale sano risponderà con un riflesso improvviso dato da un salto seguito dall'immobilità in posizione incurvata.

Test del turgore (Skin testing)

Test che misura l'elasticità della cute. Con le dita viene sollevata la cute in plica e al momento del rilascio viene misurato il tempo che impiega per ridistendersi completamente.

Il test alterato è indicativo di disidratazione.






La disidratazione può essere dovuta a causa di una mancata assunzione di liquidi oppure per un'eccessiva perdita.

I liquidi possono essere reintegrati facilitandone l'assunzione con gelatine oppure nei casi gravi con delle iniezioni SC di fisiologica sterile riscaldata.



Necta™ H2o Water Gel

Body condition scoring

	<p>BC 1</p> <p>Mouse is emaciated.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Skeletal structure extremely prominent; little or no flesh cover. • Vertebrae distinctly segmented.
	<p>BC 2</p> <p>Mouse is underconditioned.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Segmentation of vertebral column evident. • Dorsal pelvic bones are readily palpable.
	<p>BC 3</p> <p>Mouse is well-conditioned.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vertebrae and dorsal pelvis not prominent; palpable with slight pressure.
	<p>BC 4</p> <p>Mouse is overconditioned.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Spine is a continuous column. • Vertebrae palpable only with firm pressure.
	<p>BC 5</p> <p>Mouse is obese.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mouse is smooth and bulky. • Bone structure disappears under flesh and subcutaneous fat.

A "+" or a "-" can be added to the body condition score if additional increments are necessary (i.e. ...2+, 2, 2-...)

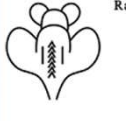


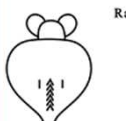
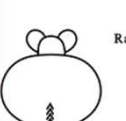
cachettico



normale



obeso

	<p>BC 1</p> <p>Rat is emaciated</p> <ul style="list-style-type: none"> • Segmentation of vertebral column prominent if not visible. • Little or no flesh cover over dorsal pelvis. Pins prominent if not visible. • Segmentation of caudal vertebrae prominent.
	<p>BC 2</p> <p>Rat is under conditioned</p> <ul style="list-style-type: none"> • Segmentation of vertebral column prominent. • Thin flesh cover over dorsal pelvis, little subcutaneous fat. Pins easily palpable. • Thin flesh cover over caudal vertebrae, segmentation palpable with slight pressure.
	<p>BC 3</p> <p>Rat is well-conditioned</p> <ul style="list-style-type: none"> • Segmentation of vertebral column easily palpable. • Moderate subcutaneous fat store over pelvis. Pins easily palpable with slight pressure. • Moderate fat store around tail base, caudal vertebrae may be palpable but not segmented.
	<p>BC 4</p> <p>Rat is overconditioned</p> <ul style="list-style-type: none"> • Segmentation of vertebral column palpable with slight pressure. • Thick subcutaneous fat store over dorsal pelvis. Pins of pelvis palpable with firm pressure. • Thick fat store over tail base, caudal vertebrae not palpable.
	<p>BC 5</p> <p>Rat is obese</p> <ul style="list-style-type: none"> • Segmentation of vertebral column palpable with firm pressure; may be a continuous column. • Thick subcutaneous fat store over dorsal pelvis. Pins of pelvis not palpable with firm pressure. • Thick fat store over tail base, caudal vertebrae not palpable.

Ullman-Cullere, M.H., Foltz, C.J . (1999) Body Condition Scoring: A Rapid and Accurate Method for Assessing Health Status in Mice. Lab. Animal Science; Vol 49 (3) 319-323.

Hickman, D.L., Swan, M. (2010) Use of a body condition score technique to assess health status in a rat model of polycystic kidney disease. J Am Assoc Lab Anim. Sci. 49(2):155-9.

Rilevamento del peso

L'assunzione di cibo nei topi e nei ratti dipende dalla formula e dal contenuto energetico del mangime, nonché dal fabbisogno nutrizionale dell'animale (che a sua volta dipende dall'età e dal peso). Per i topi, l'assunzione giornaliera di cibo è in media di circa 15 gr/100 gr di peso corporeo al giorno, per i ratti è di 4-5 gr/100 gr di peso corporeo al giorno mentre per il coniglio è di 25-49 gr/Kg/die. La mancata assunzione di cibo per un giorno sarà già evidenziato da un calo del peso di circa il 10%. Inoltre è possibile quantificare i livelli pre-studio di base del consumo di acqua e di cibo e confrontare questi valori con quelli post-procedurali. Il rilevamento del peso e la pesatura di acqua e cibo rappresentano due sistemi oggettivi, affidabili e riproducibili per rilevare il dolore negli animali e per giudicare l'efficacia di vari agenti analgesici soprattutto nella valutazione del dolore cronico.

Peso/body condition score

Quando è prevista una crescita tumorale, l'utilizzo del **BODY CONDITION SCORE** come indicatore è più accurato rispetto all'utilizzo del peso corporeo. La condizione di un animale può essere valutata sentendo i muscoli lungo la colonna vertebrale e il bacino. Una cattiva condizione porta ad atrofia muscolare, che è visibile come un "dorso affilato" e un bacino affossato.

Questo perché una riduzione del tessuto adiposo e della massa muscolare è concomitante con la crescita di un tumore. Stessa situazione quando siamo di fronte ad organi megalici o situazioni con accumulo di liquido nella cavità addominale (ascite).

Riflesso posturale

Un animale posto sul dorso in posizione supina tenderà immediatamente a riportare il corpo nella sua normale posizione quadrupedale. Questo riflesso può essere anormale o assente ed in questi casi è indicativo di gravi problemi di salute , a volte di natura neurologica.

L'incapacità di un animale di alzarsi può essere una chiara indicazione per l'eutanasia

Conclusioni

Gli argomenti che abbiamo discusso rappresentano solamente alcuni aspetti che devono essere presi in considerazione nella gestione di uno stabulario e che possono in qualche modo influire direttamente sugli animali.

Il maggior **coinvolgimento di tutti gli operatori** nella gestione degli animali, la **condivisione delle informazioni** e la **formazione del personale** rappresentano gli elementi di partenza per promuovere il tema centrale della normativa che è il benessere degli animali utilizzati a fini scientifici .

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

