

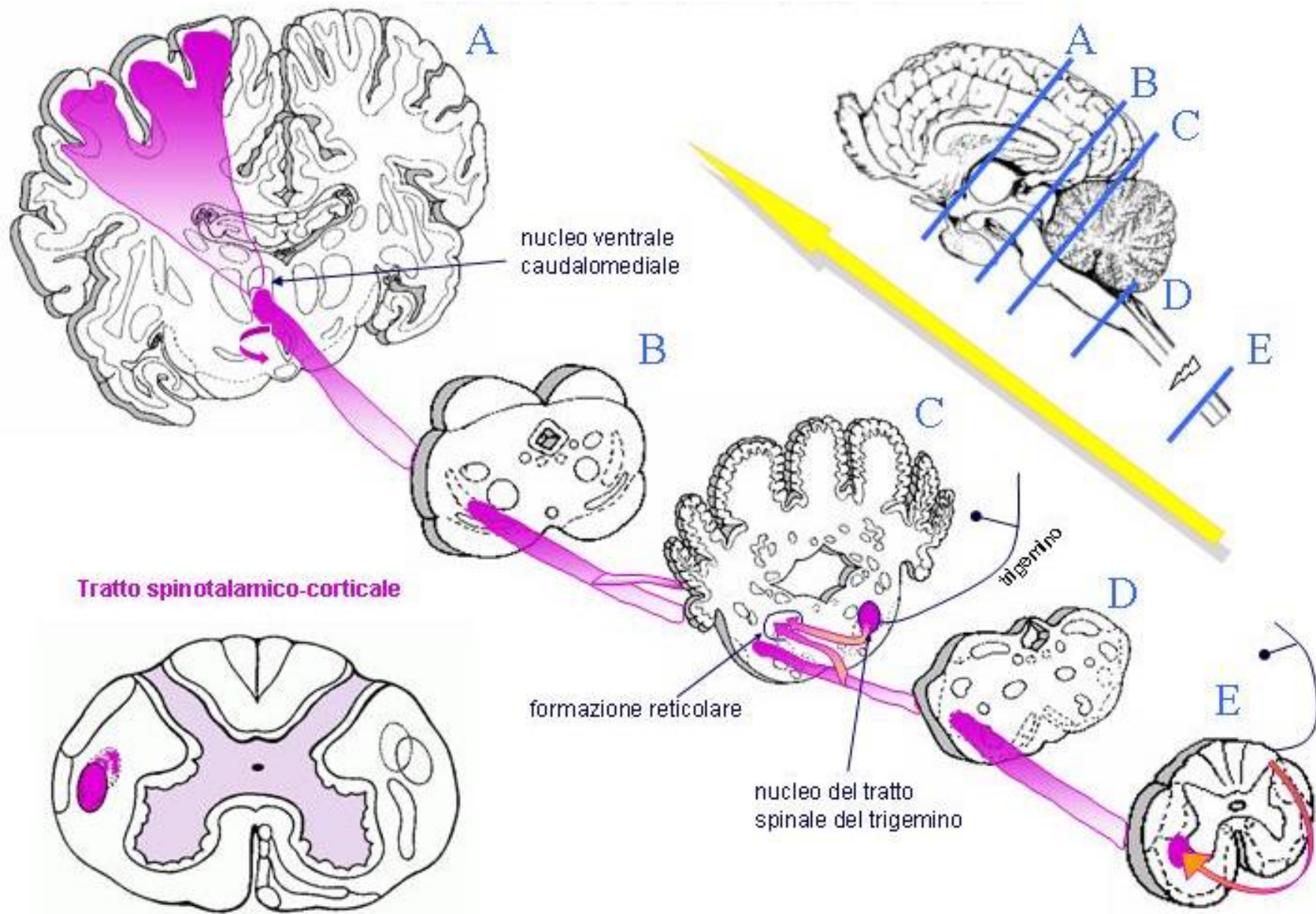
Corso di formazione in
«Protezione degli animali utilizzati a fini scientifici»

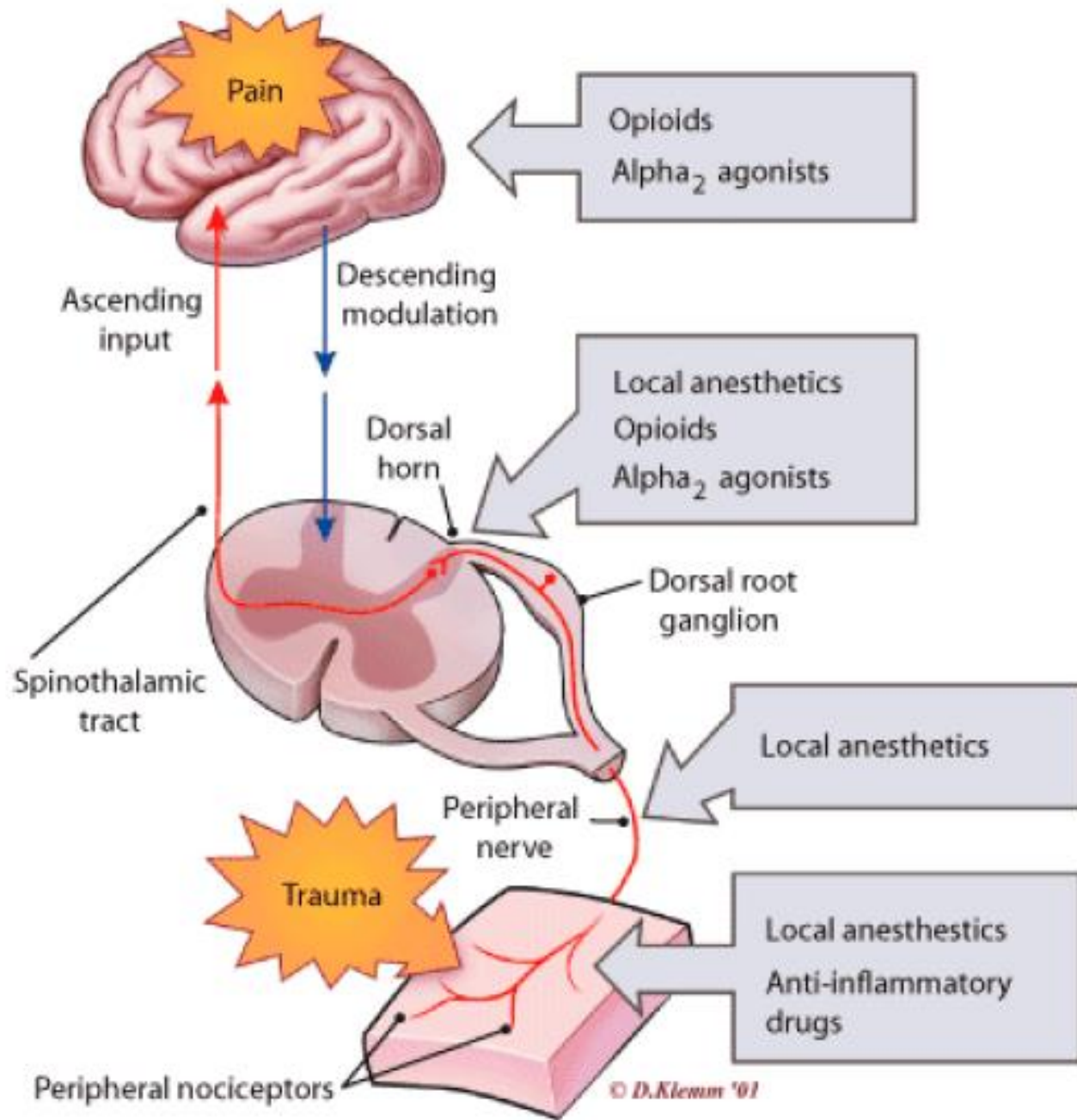
METODI DI EUTANASIA delle specie animali utilizzate a fini
scientifici e RICONOSCIMENTO DI PUNTI FINALI UMANITARI

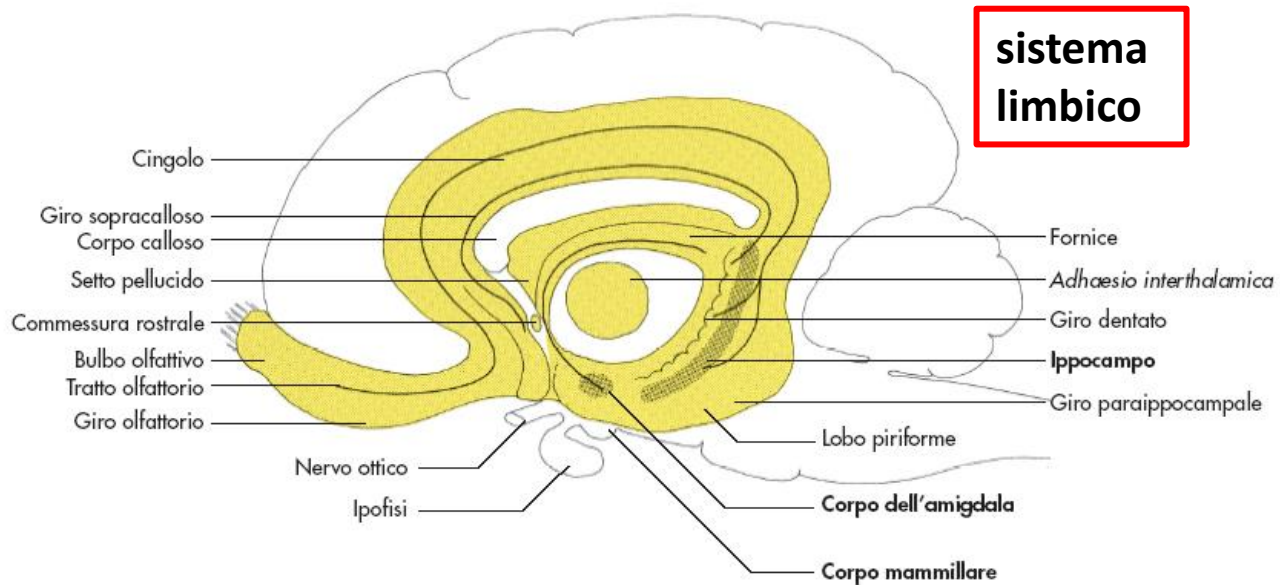
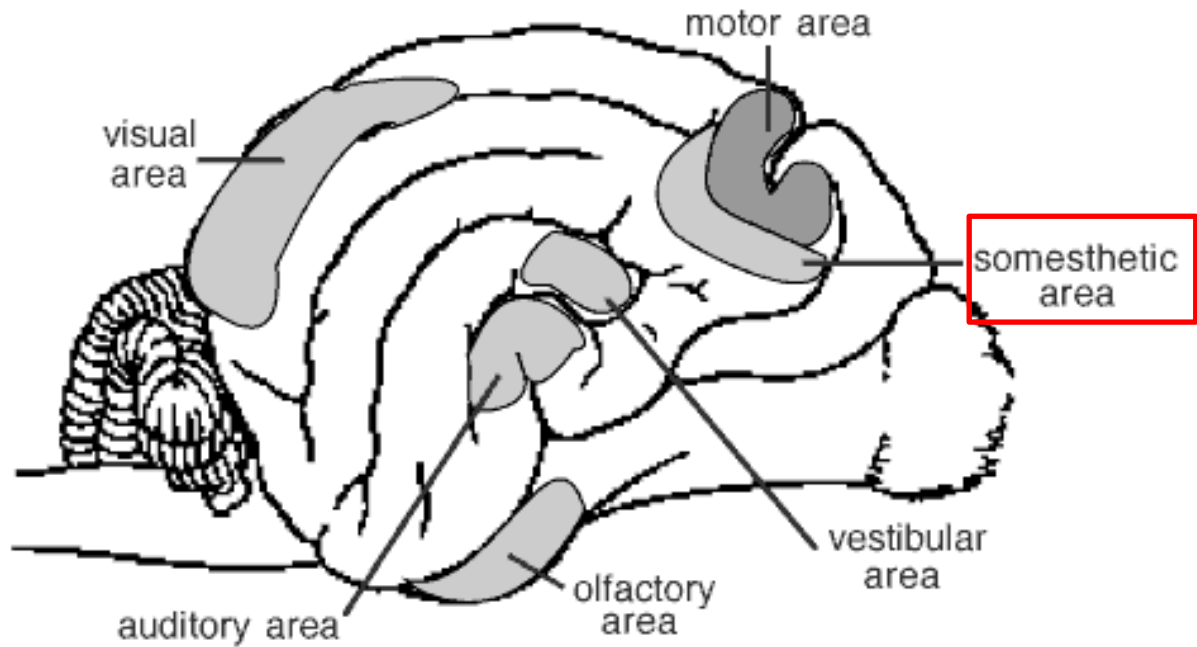
Dott.ssa ALESSANDRA COLI

- Facendo riferimento a linee guida fornite da AVMA (American Veterinary Medical Association) e fornite dalla normativa vigente (D. L n. 26/2014) sull'utilizzo degli animali a fini scientifici, l'**eutanasia** o «buona morte» è considerata come *l'atto di indurre una **morte etica**, cioè con il minore grado di sofferenza e stress possibile.*
- **Scopo** della procedura eutanasica deve essere la **rapida perdita di coscienza** seguita dall'**arresto cardiaco o respiratorio** e infine dalla **perdita delle funzioni cerebrali**.
- La **tecnica** dovrebbe **minimizzare lo stress e l'ansia** percepiti dall'animale prima della perdita di coscienza.
- **Obiettivo** del ricercatore è trovare un **equilibrio** tra il principio ideale di minimo dolore e minimo stress e la realtà dei numerosi contesti in cui si effettua l'eutanasia.
- Per garantire che le procedure utilizzate siano **adeguate** deve essere consultato un **medico veterinario** con adeguata formazione ed esperienza nella gestione della specie da sopprimere.

- I **criteri** per una **morte in assenza di dolore** si possono stabilire conoscendo i **meccanismi alla base della percezione del dolore**.
- Definizione di **dolore**: *sensazione (percezione)* che segue l'arrivo dell'impulso nervoso alla *corteccia cerebrale*, attraverso *vie nervose ascendenti*.
- Definizione di **nocicezione**: *input neuronale* attivato da *stimoli nocivi* che minacciano di danneggiare, o effettivamente danneggiano, i tessuti. Tali stimoli nocivi agiscono sulle terminazioni di particolari recettori sensitivi (**nocicettori**) attivati da fattori meccanici, termici o chimici.
- Gli impulsi nervosi generati dai nocicettori, attraverso fibre afferenti nocicettive, arrivano al midollo spinale e al tronco encefalico, da dove sono trasmessi a **2 reti di neuroni**:
 1. La **prima** è correlata ai **riflessi nocicettivi** (es., riflesso di retrazione) mediati a livello del **midollo spinale**
 2. La **seconda** è costituita da **vie ascendenti** che si dirigono al tronco encefalico (ipotalamo e talamo) e da qui alla **corteccia cerebrale** (corteccia sensitiva e sistema limbico) per la **processazione sensitiva cosciente** (corteccia sensitiva) e **comportamentale** (sistema limbico) del dolore.







Considerazioni:

- le *vie nocicettive* sono numerose, capaci di una notevole plasticità in condizioni croniche (patologia o trauma).
- la *trasmissione* di un'attività nocicettiva è altamente *variabile*: in certe condizioni possono essere soppressi sia i riflessi nocicettivi sia le vie ascendenti (ad es. in corso di anestesia epidurale).
- possono verificarsi *attività nocicettive riflesse* ma essere soppressa l'*attività delle vie ascendenti* → gli stimoli nocicettivi non vengono percepiti come dolore.

Conclusioni: non è appropriato utilizzare il termine «**dolore**» come sinonimo di «**nocicezione**» parlando in termini di stimoli, recettori, riflessi o vie nervose, poiché il termine **dolore** implica una **percezione**, mentre tutte le componenti sopra citate (**nocicezione**) possono essere *attive in assenza di una conseguente percezione algica*.

La **processazione del dolore** può presentare 2 aspetti:

- 1) **discriminativo-sensitivo**, che indica la sede di origine e lo stimolo che causa il dolore; tale processazione è dovuta a un **coinvolgimento corticale** che fornisce informazioni circa l'intensità, la durata, la sede e la qualità dello stimolo doloroso.
- 2) **motivazionale-affettivo**, che indica la *percezione della gravità* dello stimolo e determina la risposta dell'animale. Essa comprende uno stimolo verso il talamo (centro di arrivo di tutte le informazioni sensitive somatiche e viscerali), l'encefalo olfattivo e il sistema limbico che inducono disagio, paura, ansia e depressione. Queste aree cerebrali stimolano il **sistema nervoso autonomo** con attivazione riflessa dei sistemi cardiovascolare, polmonare e ipofisiario-surrenale. Tali input motivazionali-affettivi *accrescono la percezione* che deriva dalle *aree sensitive*.

Considerazioni

- Affinché sia possibile *sperimentare dolore*, la **corteccia cerebrale** e le **strutture subcorticali** devono essere **funzionanti**. Se la corteccia cerebrale *non è funzionante* a causa di ipossia, depressione farmacologica, shock elettrico o concussione, il *dolore non viene avvertito*.
- Per questo motivo la **scelta** del metodo di eutanasia è *meno critica* quando interessa un *animale anestetizzato o incosciente*, a patto che quest'ultimo non ritorni cosciente prima della morte.
- La **scelta** del metodo di eutanasia più appropriato è dettata dalla **specie animale coinvolta**, dai metodi di **contenimento** disponibili, dalle capacità del **personale** e dal **numero** di animali da sopprimere.

CLASSIFICAZIONE DEI METODI EUTANASICI

I metodi eutanasi **accettabili** sono quelli che *producono una morte etica*, quando utilizzati come unico metodo di eutanasia;

I metodi eutanasi **condizionatamente accettabili** sono quelli che, per loro natura o a causa di una maggiore possibilità di errore dell'operatore o di rischio per la sicurezza, *potrebbero non produrre una morte etica*, oppure sono metodi *non ben documentati in letteratura scientifica*;

I metodi eutanasi **non accettabili** sono quelli *considerati non etici in qualsiasi circostanza* oppure che, secondo il gruppo di esperti, *espongono a un rischio sostanziale la persona che deve applicarli*.

Nel valutare i corretti metodi di eutanasia devono essere considerati i **seguenti criteri**:

- capacità di indurre perdita di coscienza e morte senza causare dolore, stress, ansia o apprensione;
- tempo necessario per indurre la perdita di coscienza;
- affidabilità;
- sicurezza del personale;
- irreversibilità;
- compatibilità con i requisiti e i propositi;
- effetto emotivo sugli osservatori e gli operatori;
- compatibilità con la valutazione, l'esame e l'utilizzo successivi dei tessuti;
- disponibilità dei farmaci;
- compatibilità con la specie, l'età e lo stato di salute;

CONSIDERAZIONI RELATIVE AL COMPORTAMENTO ANIMALE

- Nel determinare il metodo di eutanasia, deve essere considerata la necessità di *minimizzare lo stress dell'animale*. Un contenimento rispettoso ed una manipolazione attenta durante l'eutanasia ottengono un effetto calmante.
- La *sedazione e/o l'anestesia* spesso aiutano a ottenere le migliori condizioni per l'eutanasia. **Da ricordare:** qualsiasi sedativo o anestetico somministrato in questa fase è in grado di alterare la circolazione e può ritardare l'esordio d'azione dell'agente eutanasi.
- Le *risposte comportamentali e fisiologiche* agli stimoli nocivi includono vocalizzazioni, resistenza, tentativi di fuga, aggressività difensiva o direzionata, salivazione, minzione, evacuazione di feci, dilatazione pupillare, tachicardia, sudorazione e contrazione riflessa dei muscoli scheletrici che causa tremori o altri spasmi muscolari.
- La *risposta di immobilità* non deve essere interpretata come una perdita di coscienza, perché l'animale è in realtà conscio.

MECCANISMO D'AZIONE DEGLI AGENTI EUTANASICI

Gli agenti utilizzati per l'eutanasia causano la morte attraverso tre meccanismi di base:

- 1) **Ipossia**, diretta o indiretta;
- 2) **Depressione diretta dei neuroni** necessari per le funzioni vitali;
- 3) **Distruzione fisica dell'attività cerebrale** con distruzione dei neuroni necessari per le funzioni vitali.

- 1) Affinché la morte avvenga in assenza di dolore e stress, l'**ipossia** che determina la perdita di coscienza *dovrebbe precedere la perdita dell'attività motoria* (movimenti muscolari). Gli agenti che inducono paralisi muscolare senza perdita di coscienza non sono accettabili come presidi unici per l'eutanasia (es. miorilassanti, stricnina, nicotina e sali di magnesio).
- 2) La **depressione dei neuroni cerebrali** induce perdita di coscienza seguita da morte. Alcuni agenti contrastano l'inibizione dell'attività motoria durante la prima fase dell'anestesia, determinando la cosiddetta fase di eccitazione o delirio, durante la quale l'animale può vocalizzare e presentare contrazioni muscolari. La morte che segue a perdita di coscienza è attribuibile ad arresto cardiaco e/o ipossiemia successiva alla depressione diretta dei centri respiratori.
- 3) La **distruzione fisica dell'attività cerebrale**, causata da colpo da percussione o elettrocuzione (depolarizzazione elettrica dei neuroni) induce una rapida perdita di coscienza. La morte avviene per la distruzione dei centri del *mesencefalo* che controllano l'attività cardiaca e respiratoria oppure in conseguenza dei metodi *aggiuntivi* (es., dissanguamento) utilizzati per sacrificare l'animale.

AGENTI EUTANASICI

- **AGENTI INALATORI:**
 - biossido di carbonio (CO₂)
 - azoto (N₂)
 - argon (Ar)
- **ANESTETICI INIETTABILI in overdose:**
 - derivati dell'acido barbiturico
 - cloralio idrato
- **AGENTI FISICI:**
 - proiettile captivo e libero
 - dislocazione cervicale
 - decapitazione
 - elettrocuzione
 - colpo da percussione alla testa

AGENTI INALATORI

Considerazioni preliminari

- Qualsiasi gas inalato deve raggiungere una **determinata concentrazione alveolare** per essere considerato efficace → l'eutanasia effettuata con questo tipo di agente richiede tempo.
- L'**accettabilità** di un particolare agente inalatorio è relativa alla condizione di eventuale stress tra il momento in cui inizia l'inalazione e il momento della perdita di coscienza (alcuni agenti inalatori possano indurre convulsioni prima della perdita di coscienza)

Considerazioni comuni a tutti gli agenti inalatori:

- 1) La comparsa della perdita di coscienza è più **rapida** e l'eutanasia più **etica** se l'animale viene **rapidamente** esposto a un'**elevata** concentrazione dell'agente.
- 2) La maggior parte di questi agenti è **pericolosa per il personale** per il rischio di esplosione (etere), narcosi (alotano), ipossiemia (azoto e monossido di carbonio), dipendenza (ossido di azoto) o conseguenze sanitarie dovute all'esposizione cronica (ossido di azoto e monossido di carbonio).
- 4) Negli animali con **ventilazione ridotta**, la concentrazione alveolare aumenta lentamente, accrescendo la probabilità di agitazione durante l'induzione.
- 5) I **neonati** sono **resistenti** all'ipossia per cui la morte di un neonato può richiedere più tempo rispetto all'adulto (conigli: sopravvivono per 13' all'età di 6 gg, 4' all'età di 14 gg e 1,5' all'età di 19 gg o più)
- 6) I **rettili**, **anfibi** e **uccelli** utilizzano il **metabolismo anaerobio** sospendendo la respirazione. Per questo, l'induzione dell'anestesia e il tempo necessario per la perdita di coscienza possono essere notevolmente prolungati in queste specie.

BIOSSIDO DI CARBONIO (CO₂)

- È presente nella concentrazione del 0,04% dell'aria ambiente, più pesante dell'aria e quasi inodore.
- L'inalazione di tale gas ad una concentrazione pari al 7,5% aumenta la soglia del dolore mentre concentrazioni maggiori hanno un rapido effetto anestetico.
- I segni del raggiungimento di un'anestesia efficace sono quelli rilevabili in una anestesia chirurgica profonda (es. perdita del riflesso palpebrale).
- Il tempo necessario per la perdita di coscienza si riduce utilizzando alte concentrazioni
Ratto: 80-100% → anestesia in 12-33 secondi. 70% → anestesia in 40-50 secondi.
- Il tempo necessario per la perdita di coscienza è > se la concentrazione viene aumentata *lentamente*, < se l'animale viene *immediatamente* esposto alla concentrazione piena.

- Utilizzabile per la soppressione di gruppi di piccoli animali da laboratorio (*topi, ratti*).
- I *conigli* mostrano prolungati tempi di sopravvivenza alla esposizione a CO₂ → necessaria concentrazione elevata.
- L'inalazione di CO₂ causa scarso stress nei *volatili*, elimina l'attività nervosa e induce la morte entro 5 minuti.
- Poiché la respirazione inizia durante lo sviluppo embrionale, l'ambiente del *pulcino* prima della schiusa può normalmente essere caratterizzato da concentrazioni di CO₂ fino al 14% → per l'eutanasia di pulcini appena schiusi e neonati di altre specie dovrebbe essere utilizzata una concentrazione di gas particolarmente elevata (60-70% per almeno 5')

Vantaggi

- Rapidi effetti depressanti, analgesici e anestetici ben definiti.
- Non determina accumulo di residui tissutali.
- Non modifica i marcatori colinergici o la concentrazione di corticosterone.

Svantaggi

- Alcune specie (pesci) possono mostrare una alta tolleranza.
- Rettili e anfibi respirano a bassa frequenza (metodo non elettivo).
- L'eutanasia può richiedere tempi più lunghi rispetto ad altri metodi.
- L'induzione della perdita di coscienza a concentrazioni minori (< 80%) può produrre lesioni polmonari e delle vie respiratorie superiori.

AZOTO (N₂) e ARGON (Ar)

- Gas inodori, inerti, non infiammabili e non esplosivi. N₂ costituisce il 78% dell'aria atmosferica, Ar meno dell'1%. *Azione: sostituzione dell'ossigeno e morte per ipossiemia.*
- Flusso di gas al 39% del volume: interruzione del respiro in 5-6 minuti (ratti).

Vantaggi

- Prontamente disponibili in forma di gas compressi.
- Rischi per il personale minimi.

Svantaggi

- La perdita di coscienza, preceduta da ipossiemia e iperventilazione, può determinare stress all'animale.
- Il ripristino di una bassa concentrazione di ossigeno (es. 6% o superiore) può determinare un *risveglio immediato*.
- Nei ratti questa tecnica è *condizionatamente accettabile* solo se si raggiungono rapidamente concentrazioni di ossigeno inferiori al 2% e gli animali sono profondamente sedati o anestetizzati.

Conclusioni: nonostante l'efficacia, sono preferibili altri metodi eutanasci.

ANESTETICI INIETTABILI in overdose

Considerazioni preliminari

- Metodo più rapido e affidabile, eutanasia condotta senza indurre paura o stress nell'animale.
- Se il *contenimento* necessario per effettuare un'iniezione endovenosa comporta stress all'animale o rischio indesiderato l'operatore, *si dovrebbe ricorrere alla sedazione*.
- Se la somministrazione endovenosa non è praticabile, è accettabile la *somministrazione intraperitoneale* di un agente eutanasi *non irritante* e che *non contenga agenti di blocco neuromuscolare*.
- La *somministrazione intracardiaca* è accettabile solo quando effettuata su un animale profondamente sedato, anestetizzato o in coma. Non è considerata accettabile nell'animale sveglio, a causa della difficoltà di effettuare un'iniezione accurata.
- Non sono metodi accettabili le vie *non vascolari* (intramuscolare, sottocutanea, intratoracica, intrapolmonare, intraepatica, intrarenale, intrasplenica, intratecale).

DERIVATI DELL' ACIDO BARBITURICO

- *Azione*: depressione del sistema nervoso centrale in senso discendente, dalla corteccia cerebrale, con perdita di coscienza che progredisce con l'anestesia.
- *Sovradosaggio*: l'anestesia profonda progredisce ad apnea per depressione del centro del respiro, seguita da arresto cardiaco.
- Tutti i derivati dell'acido barbiturico utilizzati per l'anestesia sono accettabili per l'eutanasia *se somministrati per via endovenosa*.
- L'esordio d'azione è *rapido* e la perdita di coscienza indotta dai barbiturici fa sì che il dolore associato alla puntura venosa sia minimo o transitorio.
- I barbiturici preferibili sono quelli a lunga durata d'azione, stabili in soluzione ed economici. Il sodio pentobarbital soddisfa al meglio questi criteri, benché siano accettabili anche altri barbiturici come il secobarbital.

Vantaggi

- Velocità d'azione, dipendente dalla dose, dalla via e velocità di somministrazione.
- Eutanasia indotta con minimo disagio per l'animale.
- Costi contenuti rispetto ad altri agenti eutanasi.

Svantaggi

- Necessaria iniezione endovenosa, per avere migliori effetti eutanasi (personale esperto).
- Animale deve essere contenuto.
- Registro accurato e utilizzazione sotto la supervisione di personale abilitato.

Conclusioni: i vantaggi sono notevolmente superiori agli svantaggi.

CLORALIO IDRATO

- *Azione*: eutanasia conseguente all' ipossiemia dovuta alla depressione progressiva del centro del respiro, preceduta da rantoli, spasmi muscolari e vocalizzazioni.

Raccomandazioni

- *Agente condizionatamente accettabile* per l'eutanasia dei grossi animali solo se somministrato per via endovenosa e dopo sedazione, per ridurre i sopra citati effetti collaterali indesiderabili.
- *Non è accettabile* per l'eutanasia di cani, gatti e altri piccoli animali perché gli effetti collaterali possono essere gravi.

METODI FISICI

- Proiettile captivo e libero
 - Dislocazione cervicale
 - Decapitazione
 - Elettrocuzione
 - Colpo da percussione alla testa
-
- *Se utilizzati da personale esperto* questi metodi possono determinare un minor grado di paura e ansia ed essere più rapidi, indolori, etici e pratici rispetto ad altre forme di eutanasia.
 - *Metodi visivamente sgradevoli.*

PROIETTILE CAPTIVO (*penetrante*)

- Utilizzato per l'eutanasia di grossi mammiferi, conigli e grandi rettili. Azione: concussione e trauma degli emisferi cerebrali e del tronco encefalico con perdita improvvisa di coscienza e successiva morte.
- Importante il contenimento adeguato per il corretto posizionamento del proiettile nelle diverse specie.
- Il proiettile *captivo non penetrante* induce stordimento dell'animale (non dovrebbe essere utilizzato come metodo unico di eutanasia).

PROIETTILE LIBERO

- *Azione*: indirizzato al cranio causa istantanea perdita di coscienza.
- Accettato per *grossi mammiferi e grossi rettili, in ambiente naturale* e mediante *operatori esperti*, in virtù della necessità di minimizzare lo stress indotto dalla manipolazione e dal contatto con l'uomo.

Considerazioni

Metodo pericoloso per il personale e visivamente sgradevole.

DISLOCAZIONE CERVICALE

- Utilizzata per l'eutanasia di uccelli, topi, ratti e conigli immaturi di peso inferiore a 1 Kg.
- *Uccelli*: perdita di coscienza può non essere istantanea (da letteratura, l'attività elettrica cerebrale persiste per 13" dopo la dislocazione cervicale e, a differenza della decapitazione, il dissanguamento rapido non contribuisce alla perdita di coscienza). Se superiori a 250 g è necessaria la sedazione
- *Topi, ratti e conigli immaturi*: la tecnica prevede la separazione delle vertebre cervicali dal cranio. Se superiori a 150 g è necessaria la sedazione

Vantaggi

- Rapida procedura e rapida perdita di coscienza.
- Non determina una contaminazione chimica dei tessuti, compreso tessuto cerebrale.

.

Svantaggi

- Metodo visivamente sgradevole.
- Richiede elevata abilità tecnica per garantire rapida perdita di coscienza.
- Limitato uso su particolari specie animali

DECAPITAZIONE

- Utilizzata per l'eutanasia di piccoli uccelli (peso inferiore a 250 Kg) e roditori, solo se altri metodi non sono praticabili.
- Benché sia stato dimostrato che l'attività elettrica cerebrale persiste per 13-14 " a seguito della decapitazione, studi più recenti indicano che la perdita di coscienza si sviluppa rapidamente.

Vantaggi

- Tecnica che induce una rapida perdita di coscienza.
- Si effettua rapidamente.
- Non determina contaminazione chimica dei tessuti, compreso tessuto cerebrale

Svantaggi

- La manipolazione e il contenimento possono essere stressanti per l'animale.
- L'interpretazione della persistenza di attività elettrica cerebrale a seguito della decapitazione è tuttora oggetto di dibattito.
- Tecnica visivamente sgradevole

ELETTROCUZIONE

- Definita anche *stordimento elettrico o elettronarcosi*, utilizzata per lo stordimento dei grossi animali, è *vietata nei roditori e rettili*

COLPO DA PERCUSSIONE ALLA TESTA

- Tale metodo induce eutanasia mediante commozione cerebrale e deve essere valutato sulla base delle caratteristiche anatomiche della specie da sopprimere.
- La commozione cerebrale può essere un metodo etico per l'eutanasia degli *animali neonati con cranio sottile* qualora un singolo colpo netto inferto con forza sufficiente in corrispondenza delle ossa centrali del cranio sia in grado di produrre l'immediata depressione del sistema nervoso centrale.
- Quando effettuata in maniera adeguata, la perdita di coscienza è rapida.

METODI DI EUTANASIA PER ANFIBI, RETTILI E PESCI

L'eutanasia degli **animali ectotermi** deve tenere in considerazione le differenze di metabolismo, respirazione e tolleranza all'ipossia cerebrale di queste specie. Per questo motivo è spesso difficile accertarne la morte.

Agenti inalatori (CO₂): molti rettili e anfibi sono in grado di smettere di respirare e passare al metabolismo anaerobio, potendo sopravvivere per lunghi periodi all'anossia (fino a 27 ore in alcune specie). A causa di questa capacità di tollerare l'anossia, l'induzione dell'anestesia e il tempo necessario per la perdita di coscienza possono essere molto prolungati. La perdita di coscienza insorge rapidamente, ma i tempi di esposizione necessari per l'eutanasia sono prolungati.

Agenti iniettabili: il **pentobarbital sodio** (60-100 mg/kg) può essere somministrato per via endovenosa, intraddominale o intrapleuroperitoneale nella maggior parte degli animali ectotermi, in base alle caratteristiche anatomiche (es. nelle rane (*xenopus*) possono essere utilizzati anche gli spazi linfatici sottocutanei). Il tempo necessario per l'effetto è variabile, e la morte può richiedere fino a 30'.

Agenti fisici

- **Decapitazione:** causa una rapida perdita di coscienza. Poiché il sistema nervoso centrale di rettili, pesci e anfibi tollera le condizioni di ipossia e ipotensione, la decapitazione deve essere associata alla totale interruzione della continuità del sistema nervoso centrale (enervazione) la cui sede è costituita dal foramen magnum (osso occipitale), identificabile negli anfibi da una lieve depressione cutanea mediana situata posteriormente agli occhi, a collo flesso.
- **Raffreddamento:** nelle specie ectoterme il preventivo raffreddamento a 4°C riduce il metabolismo e facilita la manipolazione dell'animale; *tuttavia non vi sono evidenze scientifiche che il raffreddamento di tutto il corpo riduca il dolore o sia clinicamente efficace.*

Il raffreddamento nelle rane riduce la nocicezione.

Il raffreddamento nei rettili e successivo congelamento non è metodo accettato (la formazione di cristalli di ghiaccio sulla pelle e nei tessuti può causare dolore e stress all'animale).

Il congelamento rapido di un animale in *anestesia profonda* è considerato accettabile.

CONCLUSIONI

- Ogni qualvolta divenga necessario sopprimere un animale, **la morte dovrebbe essere indotta nel modo più indolore e rapido possibile**
- Qualsiasi metodo di eutanasia comporta **vantaggi e svantaggi**. È improbabile che un metodo soddisfi i criteri desiderabili per ogni situazione.
- Si **scoraggia l'utilizzo di prodotti non approvati per l'eutanasia**, fatta eccezione per quelli con meccanismo d'azione e farmacocinetica chiaramente compresi e oggetto di studi pubblicati in letteratura che ne verifichino e giustifichino scientificamente l'utilizzo.
- Coloro che hanno un ruolo decisionale nella gestione della eutanasia devono mostrare un **atteggiamento responsabile e critico** nel valutare attentamente qualsiasi metodo o dispositivo eutanasi. In assenza di prove definitive, il processo decisionale dovrebbe essere guidato dal migliore interesse per l'animale.
- Ogni linea guida dovrebbe essere considerata **come in corso d'opera** e assicurare nuove indicazioni in seguito alla pubblicazione di ulteriori studi scientifici attinenti.