

L'inizio della "nuova era":
↳ il principio delle 3R

WMS Russel (Zoologo) e RL Burch (Microbiologo)
nel 1959 pubblicano un libro:

The Principles of Humane
Experimental technique

“**R**eplacement, **R**eduction and **R**efinement”
“Sostituzione, Riduzione e Miglioramento”

PRINCIPIO DELLE 3 R

La comunità scientifica, consapevole che allo stato attuale **non sia possibile evitare** l'utilizzo dell'animale per fini sperimentali, ha utilizzato come linea guida il **principio delle 3R**

Refinement, Reduction, Replacement

con lo scopo di ottenere

-il **miglioramento delle procedure sperimentali,**

-la **riduzione del numero di animali utilizzati**

e DOVE POSSIBILE,

-la **sostituzione di test *in vivo* sull'animale da laboratorio con dei saggi *in vitro*.**

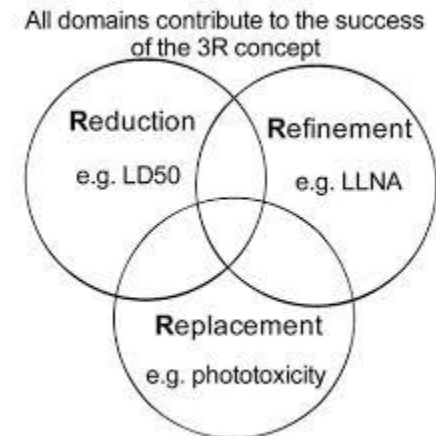
Refinement: ridurre al minimo lo stress con procedimenti meno dolorosi;



Reduction: utilizzo di un minor numero di animali;



Replacement: sostituzione degli animali con altri modelli (Burch e Russell 1959)



Replacement

Direttiva n. 2010/63/UE :

Utilizzo di metodi di sperimentazione alternativi, approvati dalla legislazione europea attraverso un preciso iter di validazione, nel quale concorrono soggetti diversi.



EURL ECVAM's
European Union Network of Laboratories for the Validation of
Alternative Methods
- EU-NETVAL -

Replacement

- **IRRITAZIONE/CORROSIONE /PENETRAZIONE/ASSORBIMENTO CUTANEO:** Epidermide umana ricostituita «in vitro»
- **GENOTOSSICITÀ:** Saggio del micronucleo su cellule di mammifero (MNT)
- **TOSSICITÀ ACUTA SISTEMICA:** Saggio di citotossicità (BALB/c 3T3 e cheratinociti normali umani NHK) per determinare le dosi iniziali per la tossicità acuta orale
- **DISTRUTTORI ENDOCRINI:** Saggio di attivazione trascrizionale dei recettori estrogeni con attività agonista
- **PRODOTTI BIOLOGICI E VACCINI:** Test ELISA per la valutazione del vaccino anti-tetanicco dell'uomo: Test di potenza del prodotto

Refinement

► Medici Veterinari

Fondamentale la conoscenza della specie (anatomia, biologia, comportamento):

1. Dimensioni gabbie/vasche
2. Fotoperiodo (buio/luce)
3. Suoni
4. Areazione e temperatura
5. Arricchimento ambientale

► Operatori

Importante la formazione relativa alla specie:

1. Corretta esecuzione delle manovre sperimentali
2. Corretta manipolazione degli animali
3. Interazione con gli animali



Refinement

Presca a due mani



Interazione



Dr. Cristiano Papeschi

<http://www.procedureswithcare.org.uk/handling-and-restraint-of-the-animal>

<https://www.research.psu.edu/arp/training/videos/handling-and-restraint-of-mice.html>

Refinement

Riduzione del disagio imposto agli animali usati nella sperimentazione

Ricercatori

- Consapevolezza della sofferenza animale
- Applicazione analgesia, anestesia quando possibile (valutando anche la sofferenza legata alla manovra)
- Condivisione dei criteri soglia per eutanasia nel contesto di «humane endpoints»

Veterinari

- Sorveglianza degli animali con frequenza legata al tipo di sperimentazione
- Applicazione di humane endpoints quanto più possibile standardizzati e condivisi per la specie ed il tipo di modello sperimentale

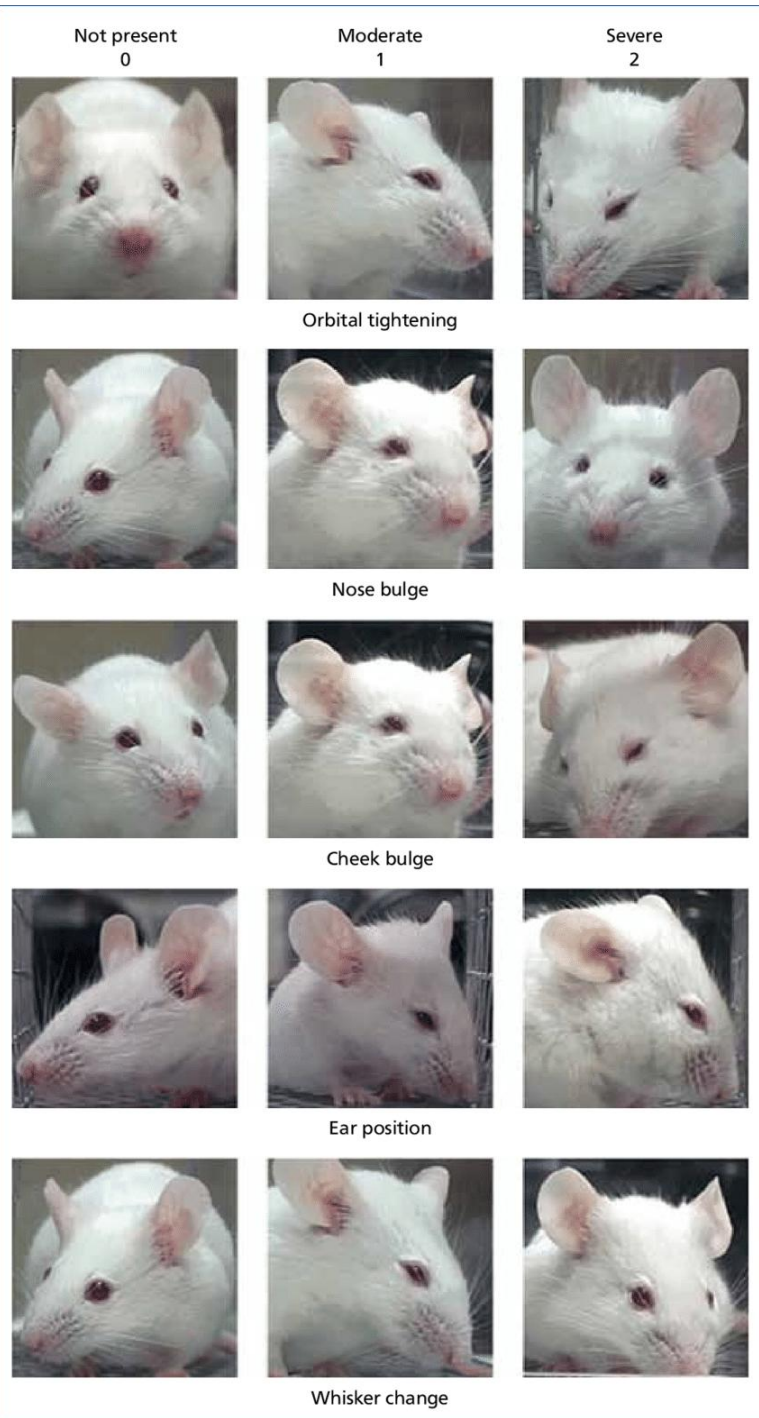
Refinement

Riduzione del disagio imposto agli animali usati nella sperimentazione

Humane endpoint: definizioni

- Il più precoce indicatore in un esperimento su animali di (potenziale) dolore e / o angoscia che, nel contesto della giustificazione morale e degli obiettivi scientifici da soddisfare, può essere usato per evitare o limitare dolore e / o angoscia mettendo in atto azioni come l'eutanasia per porre fine alle sofferenze o azioni volte ad alleviare il dolore e l'angoscia (Hendriksen e Morton, 1999).
- Il primo indicatore di dolore, angoscia, sofferenza o morte imminente sulla base del quale l'animale viene ucciso. (definizione OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development);
- Il punto in cui il dolore e / o l'angoscia di un animale deve essere interrotto o, ridotto, intraprendendo azioni come l'eutanasia o l'interruzione della procedura dolorosa o somministrando un trattamento per alleviare il dolore e / o l'angoscia" (definizione CCAC: Canadian Council on Animal Care) .
- I limiti posti alla quantità di dolore e angoscia dell'animale da esperimento accettabili nel contesto degli obiettivi scientifici da raggiungere" (Wallace 2000)

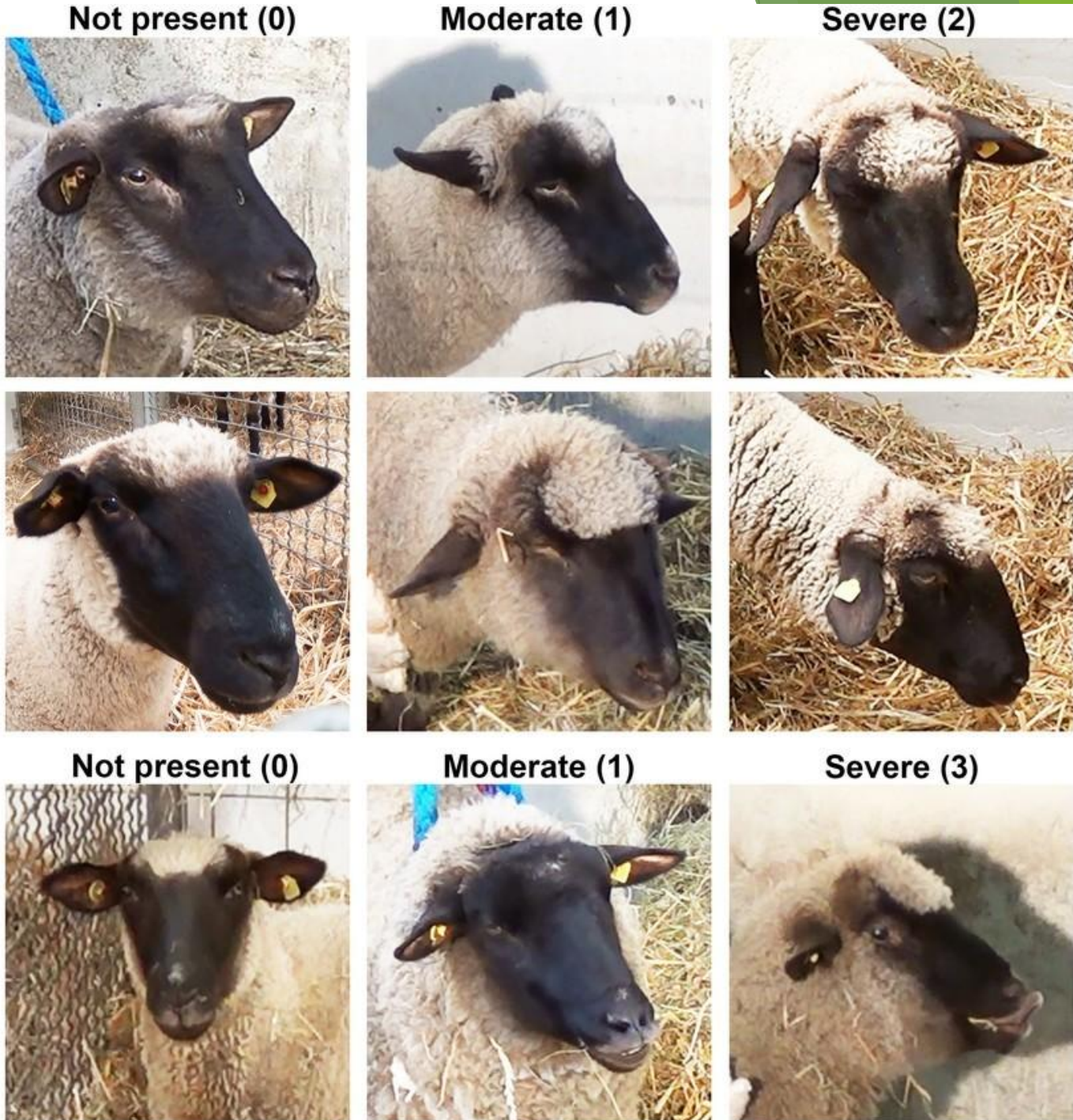




Orbital tightening

Ear & head position

Flehming



Not present (0)

Moderate (1)

Severe (3)

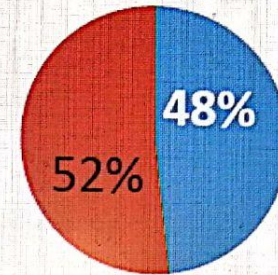
Reduction

- **Giustificazione della ricerca**

- Originalità
 - nuovo modello sperimentale
 - utilizzo di nuovi farmaci/ sostanze
 - meccanismo patogenetico

- **Ottimi disegni sperimentali**

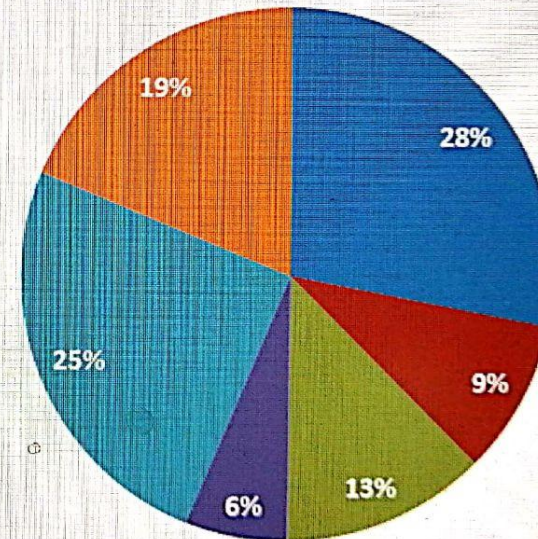
- Ipotesi sperimentale ben definita
 - Scopo principale
 - Scopi secondari
- Scelta del modello adeguata agli scopi
 - Conoscenza del modello
- Definizione dei gruppi sperimentali per la verifica dell'ipotesi
 - Definizione del gruppo /i di controllo adeguati
- Definizione dei parametri per la valutazione dell'effetto
 - Definizione del parametro principale sul quale valutare l'effetto (scopo principale)
 - Acquisizione di più dati da ogni gruppo di animali
- STIMA DELL' EFFECT SIZE



■ Richiesta Integrazioni

■ Non Integrazioni

21. Metodologia e tecnica dell'esperimento: 40%



■ 21.2 Considerazioni statistiche

■ 17.1 Stato delle conoscenze

■ 17.2 Originalità e/o interesse dello studio (valore scientifico)

■ Mancata descrizione delle metodiche per la valutazione degli obiettivi

■ Non indicazione o indicazione carente dei parametri per la valutazione della colite

■ protocollo errato

17. Razionale dello studio: 22%

PRINCIPIO DELLE 3 R

Il principio delle 3R e' stato da sempre l'elemento ispiratore della normativa e delle linee guida del settore, inclusa la nuova direttiva europea

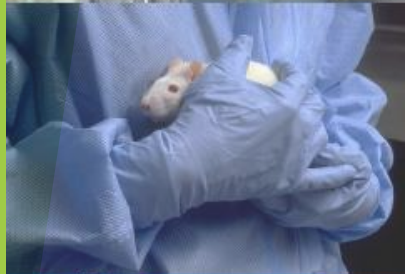
(63/2010 UE - D. Lgs 4.03.14 n.26)

Il principio delle 3R deriva dal riconoscimento della **responsabilità morale** dell'uomo nei confronti degli animali, considerati essere senzienti, che **impone di**

– **non indurre inutili sofferenze**

-**porre in atto tutti gli accorgimenti necessari al fine di garantire all'animale le migliori condizioni possibili di vita, prima, durante e dopo l'esecuzione di esperimenti,**

-**porre in atto le tecniche di eutanasia più idonee al termine dell'esperimento stesso.**



Protezione degli animali
impiegati nella ricerca:
aspetti normativi, etici e
scientifici. Decreto legislativo
26/2014



Normativa vigente in materia di animali da laboratorio

- ▶ Legge 413 del 12 ottobre 1993 sull'obiezione di coscienza
- ▶ Raccomandazione della Commissione del 18 giugno 2007 ...linee guida per la sistemazione e la tutela degli animali impiegati a fini sperimentali...
- ▶ Legge maltrattamento degli animali (n.189, 20 luglio 2004)
- ▶ Direttiva Europea 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati ai fini scientifici
- ▶ *Decreto Legislativo 4 marzo 2014, n. 26*



Legge 413/1993 : Norme sull'obiezione di coscienza

- ▶ **Articolo 1** Diritto di obiezione di coscienza 1. I cittadini che, per obbedienza alla coscienza, nell'esercizio del diritto alle libertà di pensiero, .. e religione possono dichiarare la propria obiezione di coscienza ad ogni atto connesso con la sperimentazione animale.
- ▶ **Articolo 2** ...I medici.....nonchè gli studenti universitari interessati, che abbiano dichiarato la propria obiezione di coscienza, non sono tenuti a prendere parte direttamente alle attività ed agli interventi specificamente e necessariamente diretti alla sperimentazione animale
- ▶ **Articolo 3** Le strutture pubbliche e private legittimate a svolgere sperimentazione animale hanno l'obbligo di rendere noto a tutti i lavoratori e gli studenti il loro diritto ad esercitare l'obiezione di coscienza alla sperimentazione animale.
- ▶ **Articolo 4** ..Nessuno può subire conseguenze sfavorevoli, per essersi rifiutato di praticare o di cooperare all'esecuzione della sperimentazione animale....

Legge, 189/2004 : divieto di maltrattamento degli animali

- ▶ **Art. 544-bis.** - Chiunque, per crudeltà o senza necessità, cagiona la morte di un animale è punito con la reclusione da tre mesi a diciotto mesi.
- ▶ **Art. 544-ter.** - Chiunque, per crudeltà o senza necessità, cagiona una lesione ad un animale ovvero lo sottopone a sevizie o a comportamenti o a fatiche o a lavori insopportabili per le sue caratteristiche etologiche è punito con la reclusione da tre mesi a un anno o con la multa da 3.000 a 15.000 euro.
- ▶ La stessa pena si applica a chiunque somministra agli animali sostanze stupefacenti o vietate ovvero li sottopone a trattamenti che procurano un danno alla salute degli stessi. La pena è aumentata della metà se dai fatti di cui al primo comma deriva la morte dell'animale.
- ▶ Avvelenare un animale è un reato ai sensi degli art. 544bis e 544ter del CODICE

PENALE!

Decreto Legislativo 4 marzo 2014, n.

26



VECCHIE

- ▶ *NO Utilizzo dei Randagi*
- ▶ *NO Animali Afoni*
- ▶ *Obbligo del Medico Veterinario*

NUOVE

- *NO Xenotrapianti*
- *NO studi sostanze abuso*
- *NO allevamenti cani, gatti e primati su territorio italiano*

Art. 3. Definizioni

1. Ai fini del presente decreto si intende per: a) procedura, qualsiasi uso, invasivo o non invasivo, di un animale ai fini sperimentali o ad altri fini scientifici dal risultato noto o ignoto, o ai fini educativi, che possa causare all'animale un livello di dolore, sofferenza, distress danno prolungato equivalente o superiore a quello provocato dall'inserimento di un ago secondo le buone prassi veterinarie.

Art. 15. Classificazione della gravità delle procedure.

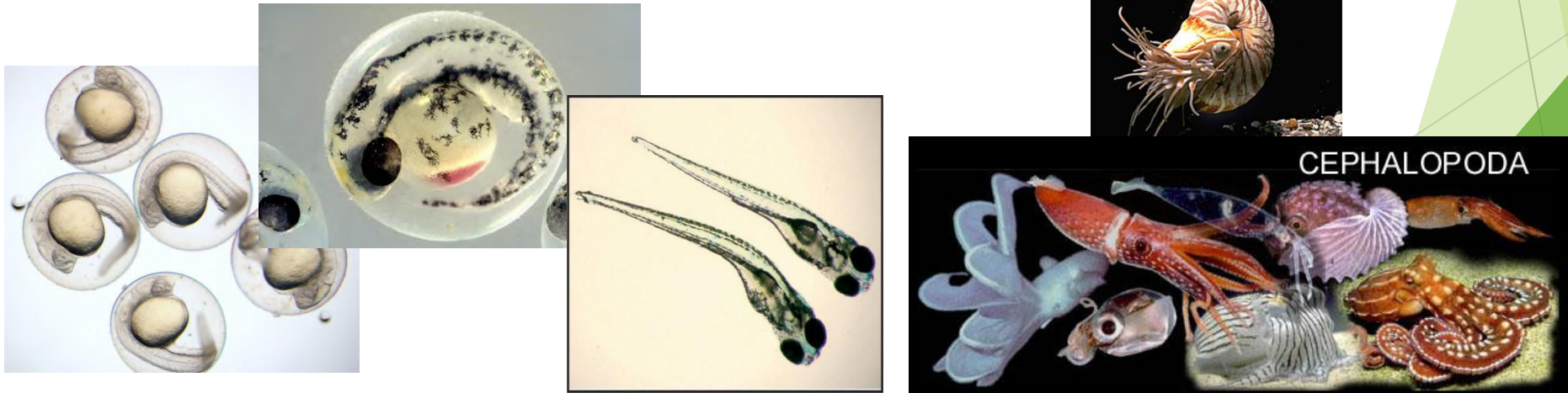
- ▶ 1. Le procedure sono classificate, caso per caso, secondo i criteri di assegnazione di cui all'allegato VII del presente decreto, come: a) non risveglio; b) lievi; c) moderate; d) gravi.
- ▶ 2. Non sono autorizzabili procedure sugli animali che comportano dolori, sofferenze o distress intensi che possono protrarsi e non possono essere alleviati.

DISPOSIZIONI GENERALI

Art. 1. *Oggetto e ambito di applicazione*

Il presente decreto si applica ai seguenti animali:

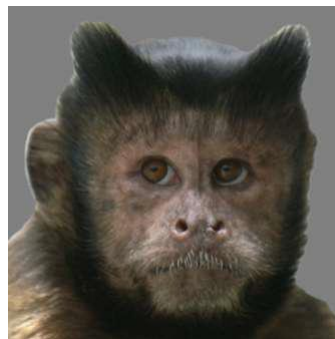
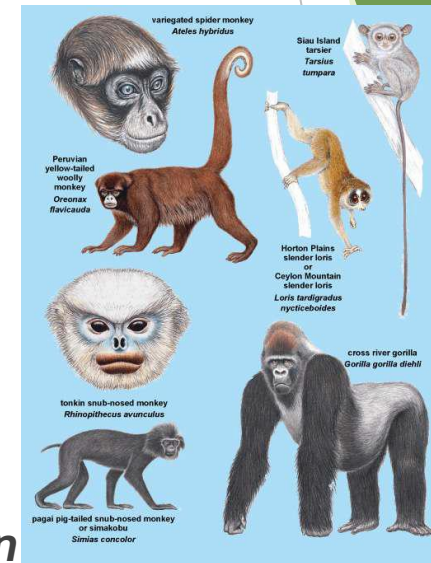
- ▶ *a) animali vertebrati vivi non umani, comprese:*
 - ▶ **1) forme larvali capaci di alimentarsi autonomamente;**
 - ▶ **2) forme fetali di mammiferi a partire dall'ultimo terzo del loro normale sviluppo;**
- ▶ *b) cefalopodi vivi.*



Divieto di impiego di:

- ▶ *Specie animali in via di estinzione*
- ▶ *Specie animali selvatiche*
- ▶ *Primati non umani*
- ▶ *Animali randagi*

Sono previste deroghe concesse dall'Autorità competen



ALLEGATO I

Elenco degli animali di cui all'articolo 10, comma 1

1. Topo (*Mus musculus*)
2. Ratto (*Rattus norvegicus*)
3. Porcellino d'India (*Cavia porcellus*)
4. Criceto siriano (o dorato) (*Mesocricetus auratus*)
5. Criceto cinese (*Cricetulus griseus*)
6. Gerbillo della Mongolia (*Meriones unguiculatus*)
7. Coniglio (*Oryctolagus cuniculus*)
8. Cane (*Canis familiaris*)
9. Gatto (*Felis catus*)
10. Tutte le specie di primati non umani
11. Rana [*Xenopus (laevis, tropicalis)*, Rana (*temporaria, pipiens*)]
12. Pesce zebra (*Danio rerio*)

Art. 13 Scelta dei metodi

Applicazione del principio delle 3R 1.

- ▶ 1. Non sono autorizzabili le procedure che prevedono l'impiego di animali vivi per le quali esistono altri metodi o strategie di sperimentazione, riconosciute dalla legislazione dell'Unione europea, ovvero prevedono metodi vietati dalla normativa vigente nazionale.
- ▶ 2. Qualora il ricorso all'impiego di animali è inevitabile sono seguite, a parità di risultati, le procedure che:
 - a) *richiedono il minor numero di animali;*
 - b) *utilizzano animali con la minore capacità di provare dolore, sofferenza, distress o danno prolungato;*
 - c) *sono in grado di minimizzare dolore, sofferenza, distress o danno prolungato;*
 - d) *offrono le maggiori probabilità di risultati soddisfacenti;*
 - e) *hanno il più favorevole rapporto tra danno e beneficio.*

ART. 13 SCELTA DEI METODI APPLICAZIONE DEL PRINCIPIO DELLE 3R 1.

- ▶ 3. Nelle procedure, **va evitata la morte come punto finale**, preferendo punti finali più precoci e umanitari. Qualora la morte come punto finale è inevitabile, la procedura deve soddisfare le seguenti condizioni:
 - a) *comportare la morte del minor numero possibile di animali;*
 - b) *ridurre al minimo la durata e l'intensità della sofferenza dell'animale, garantendo per quanto possibile una morte senza dolore.*

- ▶ Sono vietate le procedure che non prevedono anestesia o analgesia, qualora esse causano dolore intenso a seguito di gravi lesioni all'animale, ad eccezione delle procedure per la sperimentazione di anestetici ed analgesici.

Art. 19 - Liberazione e reinserimento degli animali 1.

► Gli animali utilizzati o destinati a essere utilizzati nelle procedure, previo parere favorevole del medico veterinario .., possono essere reinseriti o reintrodotti in un habitat adeguato o in un sistema di allevamento appropriato alla loro specie, alle seguenti condizioni:

- a) lo stato di salute dell'animale lo permette;
- b) non vi è pericolo per la sanità pubblica, la salute animale o l'ambiente;
- c) sono state adottate le misure del caso per la salvaguardia del benessere dell'animale;
- d) è stato predisposto un programma di reinserimento che assicura la socializzazione degli animali ovvero un programma di riabilitazione, se animali selvatici, prima della reintroduzione nel loro habitat.

Con decreto del Ministro, sono individuati i requisiti strutturali e gestionali per lo svolgimento delle attività reinserimento o riabilitazione.