



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"**
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

Sede Legale: Via Bianchi, 9 – 25124 Brescia - ITALIA
Tel. +3903022901 – Fax +390302425251 – Email info@izsler.it
C.F. - P.IVA 00284840170
N. REA CCIAA di Brescia 88834

Brescia, 18 febbraio 2019

**RELAZIONE ATTIVITA' SVOLTA PER LO SVILUPPO DEI METODI ALTERNATIVI
NELL'ANNO 2018 CON RIFERIMENTO ALLA LEGGE REGIONALE 4/2015**

Introduzione

Come previsto dalla legge regionale n. 4/2015 (Delibera Regione Lombardia X/7349 del 13.11.2017 e linee guida allegate (Allegato A)), all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna e, nello specifico al Centro di Referenza per i Metodi Alternativi, Cura e Benessere degli Animali da Laboratorio, da ora in avanti denominato CdR, è stato affidato il compito di promuovere la divulgazione e lo sviluppo dei metodi alternativi all'utilizzo di animali. In particolare, la Regione Lombardia descriveva, nei punti delle linee guida elencati di seguito, le attività da svolgere anche in collaborazione con altri Enti:

- **Punto 2** **Linee di ricerca finalizzate alla validazione di nuovi sistemi alternativi**
- **Punto 3** **Rete di ricerca regionale sui metodi alternativi utilizzati**
- **Punto 4** **Formazione di studenti universitari lombardi presso università europee che insegnino tali metodi alternativi che non fanno uso di animali**
- **Punto 5** **Formazione e comunicazione in materia di utilizzo degli animali e di metodi alternativi**

Punto 2 ***Linee di ricerca finalizzate alla validazione di nuovi sistemi alternativi***

Il CdR sta attivamente partecipando alla validazione di due metodi alternativi, che saranno di seguito descritti, e che hanno permesso di valutare l'intero percorso da affrontare da parte di un laboratorio, ente che decida di sottoporre allo *European Center for Validation of Alternative Methods* (ECVAM) la validazione di un metodo alternativo. Brevemente, le metodiche *in vitro* prevedono la valutazione di sostanze chimiche (*disruptors*) potenzialmente in grado di determinare alterazioni nell'anatomia e fisiologia della tiroide nell'uomo.

La validazione consiste di due parti, la prima per la definizione del metodo e la valutazione della sua

robustezza ed affidabilità ed una seconda parte per la valutazione complessiva del metodo, effettuando delle prove in laboratorio con delle sostanze di riferimento.

Il sistema “Zebrafish Eleutheroembryo Thyroid assay” prevede l’utilizzo di embrioni di zebrafish *Danio rerio*. Questo modello sperimentale è stato scelto in quanto il meccanismo dello sviluppo della tiroide di questa specie è in generale paragonabile a quello umano: gli studi molecolari e funzionali ne hanno dimostrato un alto grado di conservazione con i vertebrati superiori rendendolo un ottimo esempio predittivo per lo studio di alterazioni della ghiandola tiroidea dei mammiferi.

Il test prevede l’esposizione degli embrioni a sostanze considerate possibili interferenti tiroidei e, successiva valutazione al microscopio a fluorescenza per l’individuazione di alterazioni a livello dei follicoli tiroidei.

Il secondo metodo in fase di validazione è il “TRH-receptor activation of pituitary thyrotropes assay”, un test con un output chemiluminescente che viene letto tramite luminometro.

Tale metodo valuta l’attività del recettore per il TRH (ormone di rilascio della tireotropina) quando questo viene messo a contatto con sostanze agoniste o antagoniste. Il test si utilizza in concomitanza con una linea cellulare ingegnerizzata mediante un enzima in grado di emettere un segnale, in caso di attivazione da parte di una sostanza interferente con il normale funzionamento della tiroide, misurabile in chemiluminescenza.

Inoltre, durante lo svolgimento del percorso formativo “**Corso base per tutte le figure professionali coinvolte nell’utilizzo di animali (roditori e lagomorfi) ai fini scientifici ed educativi**” (Allegato 1) è stato diffusamente presentato ai partecipanti, il percorso da intraprendere per il processo di convalida.

Al termine del percorso di validazione dei due metodi sarà possibile predisporre anche un format in cui saranno elencate tutte le informazioni utili al fine di rendere l’intero percorso di presentazione ad ECVAM il più semplice e veloce possibile.

Punto 3 Rete di ricerca regionale sui metodi alternativi utilizzati

La rete di ricerca per la raccolta dei dati relativi all’applicazione dei metodi alternativi e la diffusione degli stessi ad altri enti di ricerca, è in fase di allestimento e dovrà essere fruibile sul sito di IZSLER alla pagina del sito web del CdR. L’allegato 2 indica il format che è stato predisposto per la preparazione della pagina e presenta tutte le informazioni utili per la raccolta dei dati richiesti.

Per l'anno 2019 sarà predisposto un data base di condivisione delle metodiche attualmente applicate, al fine di diffondere, come previsto dal punto 2 delle linee guida, le metodiche utilizzate nei laboratori/enti operanti in Regione Lombardia.

Con le medesime modalità sarà possibile anche accertare la reale applicazione da parte degli istituti di ricerca dei metodi alternativi, così come definiti all'articolo 2 della Legge regionale 4/2015.

Punto 4 Formazione di studenti universitari lombardi presso università europee che insegnino tali metodi alternativi che non fanno uso di animali

La predisposizione delle borse di studio previste dalle linee guida è in fase di elaborazione, infatti tale richiesta deve seguire un percorso amministrativo che non è normalmente applicato presso IZSLER.

Le modalità più idonee di assegnazione delle tre borse di studio sono in fase di studio; non appena saranno individuate le procedure amministrative corrette, si provvederà alla pubblicazione dei bandi.

Punto 5 Formazione e comunicazione in materia di utilizzo degli animali e di metodi alternativi

Relativamente all'anno 2018, il CdR ha predisposto un corso di formazione della durata di cinque giornate, il cui svolgimento è stato predisposto presso la sede di Brescia e la sede di Milano di IZSLER (Allegato 1 e 2).

Il corso è stato rivolto agli operatori del settore, individuati in differenti figure professionali: personale operante all'interno degli stabulari, Medici Veterinari, Tecnici di Laboratorio, ricercatori con diversi profili di laurea. Lo sviluppo del corso ha previsto lo svolgimento di 4 giornate individuate come corso di base ed una giornata conclusiva dedicata all'approfondimento della stesura di un progetto di studio inerente la sperimentazione animale. Quest'ultimo argomento è stato trattato sia con un approccio teorico (spiegazione ed approfondimento delle modalità di stesura del progetto) sia con un approccio pratico (suddivisione in gruppi dei partecipanti e gestione pratica del progetto).

Il corso dal titolo "Dibattiti aperti nella sperimentazione animale", rivolto storicamente a tutti gli operatori del settore a qualunque livello si è svolto presso Palazzo Feltrinelli, Gargnano del Garda (BS),

Il corso ha fornito una overview relativa alle applicazioni delle metodiche alternative in ambito della ricerca di base e di quella applicata, e la gestione degli animali da laboratorio. Nello specifico, le tematiche affrontate, hanno riguardato:

- Legislazione nazionale in vigore relativa all'acquisizione, all'allevamento, alla cura e all'uso degli animali a scopi scientifici; discussioni sulle modalità di applicazione della normativa in casi concreti
- Punto sui metodi alternativi e sulle attività di ricerca e di applicazione
- Comportamento animale, allevamento e arricchimento.
- Metodi di gestione e procedure propri alle specie
- Attività di ricerca e comunicazione dei risultati

Le giornate di studio sono il risultato della collaborazione con l'Università di Milano e la Scuola di specialità in scienza e medicina degli animali da laboratorio. I temi sono solitamente quelli attuali e riguardano l'intero settore delle attività di utilizzo animali da laboratorio e delle metodiche alternative all'utilizzo di animali

Inoltre, è stato registrato un corso di Formazione a Distanza (FAD) in collaborazione con l'ATS di Milano, Research for Life e l'Università degli Studi di Milano e che ha trattato tematiche rivolte alla divulgazione delle metodiche alternative alla sperimentazione animale. Il corso è stato rivolto agli studenti universitari, specializzandi e dottorandi impegnati in percorsi di studio di tipo biomedico, e con l'intento di approfondire la tematica delle 3Rs e l'applicazione dei metodi alternativi.

Il corso FAD sarà fruibile sul sito di IZSLER a partire da Marzo 2019.

E' stata attivata una collaborazione con l'Università di Pavia con l'intento di svolgere un'attività teorico/pratica presso i laboratori del CdR al fine approfondire le tematiche inerenti le metodiche *in vitro*, nello specifico le colture cellulari. Tale attività è stata svolta in tre giornate di frequenza presso la sede di IZSLER, durante i quali i partecipanti hanno potuto approfondire l'utilizzo e le applicazioni dei substrati cellulari nell'ambito della ricerca di base ed applicata alla farmacologia.

1. Allegati

- | | |
|------------|--|
| Allegato 1 | Programma Corso base per tutte le figure professionali coinvolte nell'utilizzo di animali (roditori e lagomorfi) ai fini scientifici ed educativi. |
| Allegato 2 | Tabella Corsi di Formazione organizzati dal CdR |
| Allegato 2 | Predisposizione format per rete informatica |

ALLEGATO 1

PROGRAMMA CORSO BASE PER TUTTE LE FIGURE PROFESSIONALI COINVOLTE NELL'UTILIZZO DI ANIMALI (RODITORI E LAGOMORFI) AI FINI SCIENTIFICI ED EDUCATIVI.

Obiettivi: Sanità veterinaria

Acquisizione competenze tecnico-professionale: La formazione di tutte le figure professionali coinvolte nell'utilizzo di animali ai fini scientifici o educativi è necessaria e obbligatoria per legge. Il corso intende sviluppare le competenze di base degli addetti e dei ricercatori, nel settore roditori da laboratorio, nella progettazione e preparazione dei progetti con utilizzo di animali al fine di sostituire gli animali dove è possibile, ridurre il numero e di migliorare lo stato degli animali utilizzati e la qualità della ricerca. L'attività è divisa in moduli, con un test finale relativo ad ogni modulo. L'organizzazione in moduli si riferisce espressamente a quanto indicato nei documenti di consenso dell'U.E. per l'applicazione della Dir. 63/2010: Quadro comune di istruzione e formazione e segue le indicazioni dell'Allegato V del d.lgs 26/2014. La giornata fa parte di un programma regionale di formazione continua degli addetti.

Categorie professionali: Biologo, Medico chirurgo, Tecnico sanitario laboratorio biomedico, Veterinario

Durata dell'evento ore: 26:30

Giorno 1 - **Modulo 1** – Legislazione nazionale

| Orario | Titolo dell'intervento | Docente |
|-------------|---|------------------------------|
| 9,30-10,30 | L' Utilizzo degli animali ai fini scientifici ed educativi, e la scienza degli animali da laboratorio. Passato e presente | Claudio Bernardi |
| 10,30-11,30 | Legislazione europea principi generali | Claudio Bernardi |
| 11,30-11,45 | Pausa | |
| 11,45-12,30 | Legislazione italiana struttura e particolarità | Guerino Lombardi |
| 12,30-13,00 | Gestione locale istituzionale delle attività di utilizzo ed allevamento degli animali | Guerino Lombardi |
| 13,00-14,00 | Pausa Pranzo | |
| 14,00-15,00 | Compiti e responsabilità delle figure operanti negli impianti di allevamento e utilizzo di animali ai fini scientifici ed educativi | Marino Campagnol |
| 15,00-15,45 | Registrazioni e tracciabilità degli animali, anche in relazione al benessere | Leonardo J. Vinco |
| 15,45-16 | Pausa | |
| 16,00-16,15 | Test per il modulo n.1 | Guerino Lombardi |
| 16,15-17,15 | Etica dell'utilizzo degli animali e del rapporto uomo animale e 3Rs | Silvia Dotti – G.Lombardi |

Giorno 2 - **Modulo 2** – Etica, benessere degli animali e Tre R (livello1)
Modulo 3.1 – Biologia appropriata di base, specifico per specie (teoria)

| Orario | Titolo dell'intervento | Docente |
|-------------|---|------------------|
| 9,00-10,30 | Metodi alternativi all'utilizzo dell'animale e dinamica delle 3R (parte 1) | Silvia Dotti |
| 10,30-11,30 | Metodi alternativi all'utilizzo dell'animale e dinamica delle 3R (parte 2) | Guerino Lombardi |
| 11,30-11,45 | Pausa | |
| 11,45-12,00 | Test sul modulo 2 | Guerino Lombardi |
| 12,30-13,00 | Gestione delle diverse specie di roditori e dei lagomorfi | Patrizia Costa |
| 13,00-14,00 | Pausa Pranzo | |
| 14,00-15,00 | Colonie murine geneticamente modificate e mutanti : produzione, mantenimento , controllo e problematiche correlate ai fenotipi sofferenti | Patrizia Costa |
| 15,00-15,45 | Anatomia, fisiologia e caratteristiche biologiche dei roditori più comuni (topo- ratto- cavia) - parte1 | Patrizia Costa |
| 15,45-16 | Pausa | |
| 16,00-17,00 | Anatomia, fisiologia e caratteristiche biologiche dei roditori più comuni (topo- ratto- cavia) – parte 2 | Patrizia Costa |
| 17,00-18,00 | Anatomia, fisiologia e caratteristiche biologiche del Coniglio | Patrizia Costa |
| 18,00-18,15 | Test sul modulo 3.1 | Guerino Lombardi |

Giorno 3 **Modulo 3.1** – Biologia appropriata di base, specifico per specie (teoria)
Modulo 4 – Cura, salute e gestione degli animali, specifico per specie (teoria)
Modulo 5 - Riconoscimento del dolore, della sofferenza, del distress -specifico per specie

| Orario | Titolo dell'intervento | Docente |
|-------------|---|------------------|
| 9,00-10,00 | Valutazione danno - beneficio – cenni su gravità delle procedure | Guerino Lombardi |
| 10,00-11,00 | Allevamento stabulazione e cura di animali (roditori e lagomorfi) | Enrico Tresoldi |
| 11,00-11,15 | Pausa | |
| 11,15-12,15 | Igiene, risanamento, contenimenti microbiologici e controllo dei parametri ambientali (roditori) | Enrico Tresoldi |
| 12,15-13,15 | Igiene, risanamento, contenimenti microbiologici e controllo dei parametri ambientali (lagomorfi) Test sul modulo 4 – prima parte | Enrico Tresoldi |
| 13,15-14,00 | Pausa Pranzo | |
| 14,00-15,00 | Organizzazione dello stabulario e importanza del programma di cura e mantenimento degli animali (roditori e lagomorfi) | Enrico Tresoldi |
| 15,00-16,00 | Dolore sofferenza e identificazione degli <i>stressors</i> | Marino Campagnol |
| 16,00-16,15 | Pausa | |

| | | |
|-------------|---|------------------|
| 16,00-17,00 | Gravita' delle procedure valutazione degli effetti anche cumulativi | Marino Campagnol |
| 17,00-17,15 | Test sul modulo 5 | Guerino Lombardi |

Giorno 4 **Modulo 4** - Cura, salute e gestione degli animali, specifico per specie (teoria)
Modulo 6.1 - Metodi umanitari di soppressione (teoria)
Modulo 7 - Procedure minimamente invasive senza anestesia, specifico per specie
(teoria)

| Orario | Titolo dell'intervento | Docente |
|--------------|--|-------------------------------|
| 9,00-10,00 | Problematiche della introduzione di roditori da altre facilities, stato sanitario e suo mantenimento. | Patrizia Costa |
| 10,00-11,00 | Problematiche della introduzione di roditori da altre facilities, Monitoraggio sanitario, | Guerino Lombardi/Silvia Dotti |
| 11,00-11,15 | Pausa | |
| 11,15-12,30 | Sicurezza negli stabulari | Guerino Lombardi |
| 12,30-13,00 | Test sul modulo 4 – seconda parte | Guerino Lombardi |
| 13,00-14,00 | Pausa Pranzo | |
| 14,00-15,00 | Eutanasia e Metodi di Soppressione umanitaria degli animali, problemi nei roditori. | Leonardo J.Vinco |
| 15,00-16,00 | Necroscopie e tecniche di prelievo | Leonardo J.Vinco |
| 16,00-16,15 | Test sul modulo 6.1 | Guerino Lombardi |
| 16,15- 16,30 | Pausa | |
| 16,30-17,15 | Procedure minimamente invasive senza anestesia (manipolazione , contenimenti , procedure sperimentali e loro impatto) | Patrizia Costa |
| 17,15-18,00 | Applicazione del principio di refinement | Patrizia Costa |
| 18,00-18,15 | Test modulo 7 | Guerino Lombardi |
| | Conclusione del corso base per addetti agli animali e ricercatori | |

CORSO BASE PER RICERCATORI COINVOLTI NELL'UTILIZZO DI ANIMALI AI FINI SCIENTIFICI ED EDUCATIVI

Obiettivi: Sanità veterinaria

Acquisizione competenze tecnico-professionale: La formazione dei ricercatori coinvolti nell'utilizzo di animali ai fini scientifici o educativi è necessaria e obbligatoria per legge. Il corso intende sviluppare le competenze di base dei ricercatori nella progettazione e preparazione dei progetti con utilizzo di animali al fine di sostituire gli animali dove è possibile, ridurre il numero e migliorare lo stato degli animali utilizzati nonché la qualità dei progetti. L'attività è divisa in moduli, con un test finale relativo ad ogni modulo. L'organizzazione in moduli si riferisce espressamente a quanto indicato nei documenti di consenso dell'U.E. per l'applicazione della Dir. 63/2010: Quadro comune di istruzione e formazione e segue le indicazioni dell'Allegato V del d.lgs.26/2014. La giornata fa parte di un programma regionale di formazione continua degli addetti. La partecipazione alla giornata prevede la conoscenza della normativa in vigore, e di avere già frequentato un corso base sull'utilizzo di animali ai fini scientifici.

Categorie professionali: Biologo, Medico chirurgo, Tecnico sanitario laboratorio biomedico, Veterinario

Durata dell'evento ore: 6:00

PROGRAMMA

Modulo 10 – Concezione di procedure e di progetti (livello 1)

Modulo 11 – Concezione di procedure e di progetti (livello 2)

| Orario | Titolo dell'intervento | Docente |
|---------------|---|-----------------------------------|
| 9,00-10,00 | Introduzione alla Biostatistica e utilizzo nella preparazione dei progetti (prima parte) | Massimo Tranquillo |
| 10,00-11,00 | Introduzione alla Biostatistica e utilizzo nella preparazione dei progetti (seconda Parte) | Massimo Tranquillo |
| 11,00-11,15 | Pausa | |
| 11,15- 12,00 | Esercitazione Test modulo 10 | |
| 12,00-13,00 | Simulazione ed Analisi di un progetto di ricerca e discussione – Preparazione della simulazione | Patrizia Costa – Guerino Lombardi |
| 13,00-14,00 | PAUSA | |
| 14,00-16,00 | Simulazione ed Analisi di un progetto di ricerca lavoro di gruppo | Patrizia Costa – Guerino Lombardi |
| 16,00-16,15 | Pausa | |
| 16,15 – 17,00 | Presentazione dei progetti e discussione | |
| 17,00 – 17,15 | Test modulo 11 | Patrizia Costa – Guerino Lombardi |
| 17,15 | Conclusione del corso base per ricercatori | |

ALLEGATO 2 TABELLA CORSI DI FORMAZIONE ORGANIZZATI DAL CDR

| TITOLO | TIPOLOGIA | ORGANIZZATO DA |
|---|------------------|--|
| Corso base per tutte le figure professionali coinvolte nell'utilizzo di animali (roditori e lagomorfi) ai fini scientifici ed educativi | Frontale | IZSLER |
| Corso base per ricercatori coinvolti nell'utilizzo di animali ai fini scientifici ed educativi | Frontale | IZSLER |
| Sperimentazione animale: corso base dal concetto di 3Rs alla normativa vigente | FAD | IZSLER, Research for Life, ATS Milano, Regione Lombardia, Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare, Università degli Studi di Milano |
| Corso teorico/pratico colture cellulari | NA | IZSLER |

ALLEGATO 3 PIATTAFORMA PER CENTRO DI REFERENZA METODI ALTERNATIVI ALLA SPERIMENTAZIONE ANIMALE

La piattaforma dovrà consentire ad utenti esterni ad IZSLER un accesso al fine di inserire dati inerenti il proprio ambito di lavoro.

Nello specifico le informazioni che dovranno essere raccolte sono le seguenti.

| | |
|--|--|
| Struttura di appartenenza | |
| Tipologia di struttura (Pubblico, Privato) | |
| Indirizzo | |
| Persona di riferimento | |
| Contatti (telefono ed indirizzo posta elettronica) | |

| | | | |
|---------------------|----------------------------|----------------------|-------------|
| Presenza stabulario | sì | Tipologia animali | Numero/anno |
| | | Roditori | |
| | | Lagomorfi | |
| | | Pesci | |
| | | Altro (campo libero) | |
| | Responsabile del Benessere | Nominativo | |
| | | Contatto | |
| | Veterinario Designato | Nominativo | |
| | | Contatto | |
| | no | | |

| | | |
|-----------------------------------|--------------------|--|
| Personale presente ^(*) | Titolo di studio | |
| | Attività | |
| | Tipo di Formazione | |

^(*) Possibilità di duplicare i campi in base al numero di personale presente

Indicare la/le finalità delle attività di ricerca condotte nella struttura.

(Le informazioni richiamano il modello comune per la trasmissione delle informazioni di cui all'articolo 54, paragrafo 2, della Direttiva 2010/63/UE, stabilito con Decisione di Esecuzione della Commissione del 14 novembre 2012)

| | | |
|----------|--|-------------|
| Finalità | Ricerca di base | specificare |
| | Ricerca traslazionale o applicata | specificare |
| | Impieghi previsti dalla normativa e produzione ordinaria | specificare |
| | Protezione dell'ambiente nell'interesse della salute o del benessere degli esseri umani o degli animali | |
| | Conservazione delle specie | |
| | Insegnamento superiore o formazione ai fini dell'acquisizione, mantenimento o miglioramento competenze professionali | |
| | Indagini medico-legali | |
| | Mantenimento di colonie di animali geneticamente modificati stabilizzati, non utilizzati in altre procedure | |

| | | | |
|---------------------------------|-------------------|----------------------|------------------|
| Applicazione metodi alternativi | sì | Tipologia di metodo | |
| | | <i>In vitro</i> | <i>In silico</i> |
| | | Altro (campo libero) | |
| | Breve descrizione | | |
| | no | | |

^(*) Possibilità di duplicare i campi in base al numero di metodi alternativi applicati

| | | | |
|--------------------------------|----|----------------------|------------------|
| Sviluppo metodi alternativi | sì | Tipologia di metodo | |
| | | <i>In vitro</i> | <i>In silico</i> |
| | | Altro (campo libero) | |
| | no | | |

| | | | |
|-----------------------------------|----|----------------------|------------------|
| Validazione metodi alternativi | sì | Tipologia di metodo | |
| | | <i>In vitro</i> | <i>In silico</i> |
| | | Altro (campo libero) | |
| | no | | |

| | | | |
|---|----|----------------------|------------------|
| Esecuzione metodi alternativi come attività per clienti | sì | Tipologia di metodo | |
| | | <i>In vitro</i> | <i>In silico</i> |
| | | Altro (campo libero) | |
| | no | | |

Gli utenti dovrebbero accedere eseguendo una registrazione con user e password.

Le informazioni devono essere visibili solo dal personale di IZSLER autorizzato (area riservata).

La Responsabile del Centro di Referenza dei Metodi Alternativi,
Benessere e Cura degli Animali da Laboratorio

Dr.ssa Silvia Dotti