

Le ultime novità
del NC3R per i guardiani
di animali

Tech3Rs

Benvenuti all'ultima edizione di Tech3Rs

Questa newsletter si rivolge a guardiani di animali e stabularisti che lavorano negli istituti di ricerca per aiutare a identificare le opportunità per mettere in pratica le 3R e garantire elevati standard di benessere animale. Se avete idee per i prossimi numeri o state lavorando a un approccio alle 3R che vorreste venisse presentato, contattateci: ci piacerebbe sentirvi! Potete scriverci a tech3rs@nc3rs.org.uk.

In questo numero discutiamo di come una manipolazione delicata e una corretta assuefazione portino a procedure a basso stress per topi e ratti. Segnaliamo inoltre due testimoni Tech3R che portano miglioramenti per i pesci zebra, le registrazioni di webinar sulla valutazione dell'arricchimento ambientale, sul microcampionamento e il rinnovato sito web sui macachi.



Non
perdetevi il
prossimo
numero!

Tech3Rs è pubblicato online - www.nc3rs.org.uk/tech3rs Se desiderate ricevere un'e-mail quando verrà pubblicato il prossimo numero di Tech3Rs, inviateci un'e-mail all'indirizzo tech3rs@nc3rs.org.uk con oggetto "Subscribe".



Manipolazione e assuefazione di topi e ratti per procedure a basso stress

Un webinar imperdibile per chiunque lavori con i roditori nella ricerca

Creare fiducia e cooperazione tra animali da ricerca e operatori migliora il benessere degli animali e l'affidabilità degli studi, riducendo lo stress durante le procedure scientifiche. In un webinar organizzato dal NC3R, Therése Ahlström, ingegniera di laboratorio e tecnica degli animali, ha parlato dell'approccio pionieristico adottato dai Research Institutes of Sweden (RISE) per perfezionare le procedure con topi e ratti. Therése Ahlström ha sottolineato l'importanza di migliorare tutti gli aspetti della vita degli animali da ricerca, soffermandosi sugli alloggi arricchiti e sulla socializzazione prima di concentrarsi sull'importanza di una manipolazione costante e delicata e di un'adeguata assuefazione.

La manipolazione delicata comprende un approccio raffinato nel prelevare i topi (ad esempio utilizzando un tunnel), ma Therése e i suoi colleghi vanno oltre per rendere tutte le interazioni con i topi e i ratti il più positive possibile, anche per gli studi su larga scala. Tutti i roditori vengono abituati alla manipolazione in cinque sessioni durante un periodo di acclimatazione di due settimane prima dell'inizio dello studio. Ogni sessione dura da uno a due minuti

e consiste nel maneggiare con calma e sicurezza i roditori in modo delicato, anche prendendoli in braccio e accarezzandoli.

Per preparare i topi e i ratti a ciò che accadrà durante lo studio, vengono effettuati ripetuti contatti con le parti del corpo che saranno manipolate nell'ambito delle procedure. Ad esempio, se la vena caudale verrà utilizzata per raccogliere il sangue, la coda viene accarezzata e manipolata delicatamente prima dell'inizio dello studio. I topi e i ratti familiarizzeranno inoltre con le attrezzature, come i rasoi elettrici usati per rimuovere i peli.

Per creare un'associazione positiva con la manipolazione, i roditori vengono premiati e tenuti a proprio agio con una lettiera



Costruire la fiducia riduce lo stress per animali e operatori.

Testimoni delle 3R

In questo numero di Tech3Rs presentiamo due tecnici che stanno promuovendo miglioramenti per i pesci zebra nei loro istituti.

Haley Gatzogiannis è Vivarium Operations Supervisor al Novartis Institutes for BioMedical Research, USA. Ci ha parlato del passaggio dal taglio delle pinne al tampone cutaneo per il campionamento del DNA dei pesci zebra.

Quale idea delle 3R avete attuato?

Lavoro con pesci zebra transgenici e parte del mio lavoro quotidiano consiste nel raccogliere campioni di DNA dai pesci per la genotipizzazione (identificazione del loro patrimonio genetico). In precedenza, il nostro approccio standard consisteva nel prelevare campioni di pinne (taglio delle pinne). Ora abbiamo implementato un metodo meno invasivo per raccogliere il DNA dai pesci zebra. Al posto del tessuto delle pinne, campioniamo lo strato di muco sul fianco del pesce che contiene cellule epiteliali espulse. I campioni di muco possono essere utilizzati in modo molto simile ai campioni di pinne per il sequenziamento del DNA. Ora disponiamo di un protocollo ufficiale per la raccolta di campioni di DNA da pesci zebra mediante un tampone cutaneo, l'elaborazione dei campioni e l'amplificazione del DNA per il sequenziamento interno, in modo da ottenere risultati accurati di genotipizzazione.

Come avete sviluppato questo approccio?

Abbiamo riunioni regolari del gruppo 3R per assicurarci di essere sempre aggiornati e di eseguire le procedure nel modo più raffinato. I miei colleghi mi hanno fatto conoscere una tecnica raffinata per la genotipizzazione dei pesci zebra. Avevano trovato informazioni sulla tecnica del tampone nella letteratura e nel sito web dell'NC3Rs. Ho pensato che fosse un'idea grandiosa e che avremmo potuto provare facilmente. Mi è subito piaciuta perché si trattava di una tecnica meno invasiva del taglio delle pinne, senza la necessità di anestesia o di rimozione dei tessuti. Io e i miei colleghi abbiamo cercato di capire se fosse possibile ottenere concentrazioni di DNA adeguate per ottenere risultati di qualità nel sequenziamento.

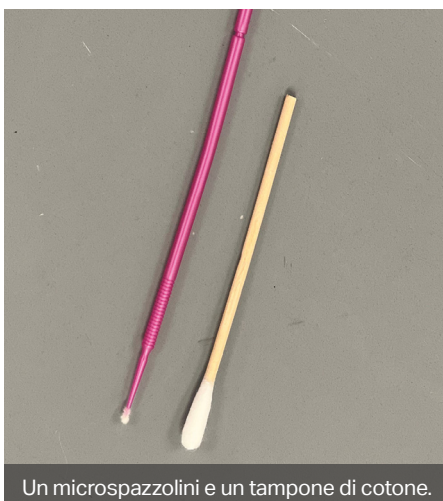
Per evitare l'uso di zebrafish vivi mentre ci familiarizzavamo con la tecnica del tampone, abbiamo ottenuto dei cadaveri

attraverso progetti di ricerca in corso. In questo modo abbiamo evitato l'uso di altri pesci, permettendoci di studiare in modo rispettoso la possibilità di ottenere campioni di tampone di qualità dallo strato di muco. Per effettuare confronti diretti, abbiamo prelevato due campioni da ciascun cadavere di zebrafish: un campione bioptico di tessuto della pinna e un tampone dello strato di muco. Abbiamo riscontrato che la fedeltà dei campioni di tampone era buona, con una corrispondenza del 100% tra i risultati del DNA delle pinne e delle cellule della pelle, convalidando questo approccio per la genotipizzazione dei nostri pesci zebra. Un modo per ottimizzare la tecnica di raccolta dei campioni è stato quello di passare dal tipico tampone di cotone a un microspazzolino, chiamato anche microapplicatore. Il microspazzolino era meno assorbente del tampone di cotone e si adattava bene a una piastra da 96 pozzetti, il che era conveniente dato che è quello che usiamo per i campioni di DNA.

È stato impegnativo trovare il modo migliore e più efficiente per trattenerne i pesci non anestetizzati, ma abbiamo un'équipe che fornisce supporto per i nuovi approcci e ho lavorato a stretto contatto con loro per sviluppare una metodologia



Pesci zebra (stock image).



Un microspazzolino e un tampone di cotone.

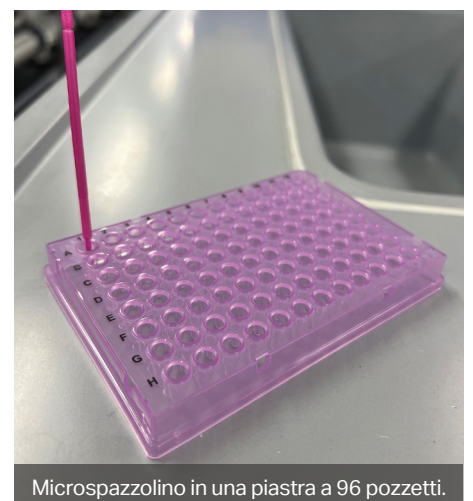
che fosse efficiente e minimamente angosciante per i pesci. Usiamo una spugna bagnata, mani guantate e una rete.

Che impatto ha avuto questo progetto su di voi?

La nostra priorità era quella di migliorare la tecnica di campionamento del DNA a vantaggio degli animali, quindi è bello aver lavorato in squadra per raggiungere questo obiettivo. Circa il 22% di tutti gli animali necessari per la nostra R&S sono pesci zebra e, anche se non tutti questi pesci saranno genotipizzati, questo perfezionamento avrà comunque un impatto positivo su un numero significativo di animali.

Sulla base del successo ottenuto nel sito statunitense, ho condiviso il nuovo approccio con i colleghi svizzeri che stanno valutando l'adozione della tecnica del tampone. L'implementazione di questo perfezionamento e la sua condivisione hanno portato il nostro team a ricevere il premio Novartis Global 3Rs Award for Refinement del 2022.

Il mio consiglio a chiunque voglia portare un cambiamento efficace per gli animali affidati alle nostre cure è di collaborare: questo progetto ha incluso input e feedback da parte di molti gruppi diversi presso la nostra sede. Questo risultato è arrivato dall'unione delle nostre conoscenze in materia di pesci zebra a quelle dei nostri esperti veterinari e di benessere degli animali, degli scienziati e del team che si occupa delle procedure tecniche innovative.



Microspazzolino in una piastra a 96 pozzetti.

Diane Fleary-Jones è una tecnologa animale dell'Università di Birmingham. Ci ha parlato della valutazione dell'arricchimento ambientale per i pesci zebra.

Quale idea delle 3R avete sviluppato?

Ho intrapreso un test per indagare quali tipi di arricchimento strutturale preferiscono i nostri pesci zebra e se questi hanno un impatto sulla deposizione delle uova. I dati raccolti durante il mio studio su piccola scala vengono utilizzati per apportare dei cambiamenti all'interno della nostra unità, dove abbiamo circa 200 vasche di pesci zebra. Con il sostegno dei miei colleghi, un elemento di arricchimento da me progettato sarà presto uno standard nelle nostre vasche di pesci zebra.

Questo articolo andrà ad aggiungersi all'arricchimento ambientale la cui efficacia è già dimostrata sperimentalmente: un adesivo di ghiaia sotto ogni vasca, una pianta di plastica disponibile in commercio e cibo vivo. È stato dimostrato che i pesci zebra preferiscono gli adesivi di ghiaia e le piante alle vasche vuote e che il cibo vivo stimola il comportamento predatorio naturale [1]. Sono stata motivata a effettuare una valutazione personale per adottare un approccio consapevole alla scelta di un nuovo arricchimento.

Come avete sviluppato questo progetto?

Ho utilizzato le informazioni pubblicate e le mie esperienze personali di lavoro e cura dei pesci, compresi i pesci zebra, per progettare diverse strutture con cui pensavo che i pesci zebra avrebbero interagito. Ho costruito elementi di arricchimento strutturale ispirati agli habitat acquatici naturali. Tra questi, un telo chirurgico progettato per simulare le piante galleggianti, un divisorio di plastica con due fori attraverso i quali i pesci potevano nuotare e un sistema di fascette ancorate a un bastone nella parte superiore della vasca per simulare le fronde che si estendevano verso il basso nell'acqua.

Ho lavorato con il nostro responsabile del programma regionale NC3Rs, la dottoressa Nicola Foster, per progettare e realizzare una valutazione che rispondesse alle domande: "Con quali elementi di arricchimento i pesci interagiscono maggiormente?" e "Gli elementi di arricchimento hanno un

impatto sulla deposizione delle uova?". Alcune strutture in vasca possono indurre i pesci zebra a deporre spontaneamente le uova. Questo è un fenomeno che dobbiamo evitare quando controlliamo i tempi di deposizione delle uova per scopi di ricerca, quindi era importante raccogliere dati su questo aspetto.

Un'ulteriore sfida con i pesci zebra è decidere cosa misurare per determinare se gli oggetti di arricchimento migliorano il loro benessere. Abbiamo ipotizzato che i pesci zebra scelgano di interagire con gli oggetti che preferiscono e che questa interazione indichi un impatto positivo sul benessere. Abbiamo anche monitorato i comportamenti che potrebbero indicare un effetto negativo dell'arricchimento sul benessere, come le interazioni aggressive.

Qual è stato il risultato del progetto?

I dati che ho raccolto dalla sperimentazione sull'arricchimento sono stati presentati alla riunione del nostro gruppo di discussione sulle 3R. Non abbiamo riscontrato alcun aumento degli indicatori di benessere negativo per nessuno degli elementi di arricchimento valutati. I pesci sono stati osservati interagire con le "fronde" delle fascette più frequentemente rispetto agli altri elementi, ad esempio nuotando attraverso di esse. Questo elemento di arricchimento ha anche avuto un impatto minimo sulla deposizione delle uova. Questi elementi ci hanno portato a concludere che, tra le opzioni presentate, l'arricchimento con fascette era il migliore per il benessere dei pesci zebra e per i nostri scopi di ricerca.

Discutendo il progetto, sono state sollevate preoccupazioni riguardo alla plastica delle fascette nell'acqua della vasca. Abbiamo quindi deciso di realizzare una struttura simile utilizzando un materiale già approvato per l'uso in acquario: un tubo flessibile disponibile in commercio. Stiamo aspettando che arrivi prima di poter introdurre il nuovo arricchimento in tutte le vasche dei pesci zebra.

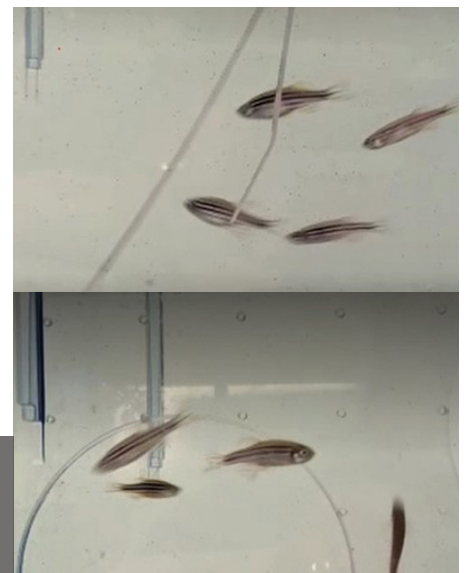
Riferimenti:

[1] RSPCA Zebrafish behaviour and welfare posters bit.ly/41mP2aC.

Sopra: il team si sta procurando materiale sicuro creare fronde che si estendono nell'acqua. Sotto: in divisorio trasparente può aumentare la complessità dell'habitat senza interferisce con i controlli visivi.

Come valutare l'arricchimento per i

1. Discutete con i vostri colleghi e ottenete l'autorizzazione prima di iniziare a pianificare una valutazione.
2. Stabilite il numero di gruppi necessari e allestite un numero adeguato di vasche; assicuratevi di includere un gruppo di controllo senza arricchimento o con l'arricchimento già in uso.
3. Verificate che i materiali utilizzati non trasudino o interferiscano con il flusso d'acqua.
4. Includete nella valutazione l'arricchimento che già utilizzate: gli animali possono rispondere in modo diverso se l'arricchimento se è combinato con altri elementi.
5. Date agli animali il tempo di abituarsi al nuovo arricchimento.
6. Monitorare gli effetti sulla deposizione delle uova: i ricercatori vorranno vedere questi dati.
7. Fotografate e riprendete tutto. Date ai pesci il tempo di adattarsi a qualsiasi disturbo prima di filmare.
8. Fate ruotare gli elementi in ogni gruppo per assicurarvi che non si tratti della preferenza di un singolo gruppo (o di un pesce).



morbida autoclavabile che viene fornita anche durante le successive procedure sperimentali. In definitiva, queste brevi sessioni mirano a ridurre la sofferenza associata alla manipolazione umana e alle procedure avverse e a creare fiducia tra animali e operatori. I video condivisi da Therése dimostrano che il tempo iniziale investito per preparare i roditori è molto proficuo. I topi e i ratti interagiscono volentieri con il personale e appaiono calmi, collaborativi e in generale non turbati durante i prelievi e le somministrazioni che avvengono senza particolari costrizioni. Therése e i colleghi riferiscono che il loro approccio permette osservazioni più accurate dopo la somministrazione, con un rischio ridotto di confondere i comportamenti legati allo stress con quelli legati alla sostanza. Un ulteriore vantaggio è l'impatto sul benessere del personale: lavorare con animali calmi, fiduciosi e collaborativi può ridurre notevolmente lo stress degli operatori. Come spesso accade quando si implementano dei miglioramenti, Therése afferma che una volta cambiato il modo di lavorare non si vuole più tornare indietro.

Per vedere i risultati impressionanti che derivano da questo approccio e per saperne di più su come questi perfezionamenti vengono applicati con diverse procedure di campionamento e dosaggio, guardate la registrazione del webinar nc3rs.org.uk/handling-and-training-mice-and-rats-low-stress-procedures e rivedete i punti principali del Simposio dei tecnici animali NC3Rs/IAT 2019 nc3rs.org.uk/2019IATNC3Rs.



I roditori sono a proprio agio durante l'assuefazione e le procedure.

L'approccio adottato dai RISE per le procedure a basso stress con topi e ratti

- La manipolazione delicata inizia all'arrivo degli animali nella struttura, a partire dal momento in cui escono dalla gabbia.
- Topi e ratti ricevono, prima dell'inizio dello studio, cinque sessioni di assuefazione della durata di uno o due minuti ciascuna.
- Le sessioni si concludono sempre con qualcosa di positivo, come una ricompensa o una carezza per i topi.
- Il protocollo di studio indica quali parti del corpo sono sottoposte a manipolazione aggiuntiva e con quali attrezzature gli animali devono avere familiarità.
- Durante la prima sessione i roditori stanno su una lettiera comoda e vengono accarezzati delicatamente.
- Durante le sessioni da due a cinque gli animali si abituano a tutto ciò che incontreranno durante l'esperimento, come nuovi ambienti e attrezzature.



I topi interagiscono volontariamente con l'operatore, anche dopo le procedure.

Da Tech3Rs al premio Andrew Blake Tribute

Congratulazioni ad Alicia Kinally, ex testimone di Tech3Rs, per aver vinto il premio IAT Andrew Blake Tribute per i suoi miglioramenti nella gestione dei conigli. Nel numero 15 di Tech3Rs Alicia, una tecnica animale dell'Università di Leicester, ha condiviso il suo approccio per migliorare la cattura quotidiana dei conigli. Il progetto di Alicia si è concentrato sull'incoraggiamento dei conigli a entrare volontariamente in un trasportino che ora ha sostituito la cattura manuale.

L'intervista ad Alicia Kinally è stata pubblicata sul numero 15 a pagina 4 nc3rs.org.uk/Tech3Rs.

Una guida video sulla manipolazione e il sollevamento dei conigli, compreso un filmato di Alicia che trasporta un coniglio con il metodo qui descritto, è disponibile sulla nostra pagina dedicata alla stabulazione e all'allevamento dei conigli nc3rs.org.uk/rabbit-handling#handling.



Alicia con un coniglio nel trasportino.

Aggiornamenti dal

Registrazione del webinar: ‘Il microcampionamento in tossicologia: massimizzare i vantaggi scientifici, commerciali e delle 3R’

In collaborazione con la British Toxicology Society (BTS), l'NC3Rs ha organizzato un webinar per far conoscere la tecnica del microcampionamento e incoraggiarne una più ampia adozione in tossicologia. Il microcampionamento è un approccio che prevede il prelievo di un volume molto piccolo di sangue da un animale, in genere ≤50 µl. Questa procedura è più rapida e meno stressante e può ridurre il numero di animali utilizzati in uno studio.

Sono disponibili online sei presentazioni che trattano argomenti diversi, tra cui quella della dottoressa Hollie Blunt (Sequani) sui benefici per il benessere animale del microcampionamento per topi, ratti, conigli, cani e minipig.

Guarda le relazioni per saperne di più sul microcampionamento nc3rs.org.uk/microsampling-toxicology-maximising-scientific-business-and-3rs-advantages.

Il sito web dedicato ai macachi

Il sito web sui macachi è una risorsa gratuita per tutti coloro che lavorano o sono interessati ai macachi da laboratorio. Contiene informazioni, video e audio che forniscono indicazioni pratiche sulla storia naturale e sul comportamento dei macachi, sulla loro cura e gestione in cattività e su come valutare il loro benessere. Gli argomenti trattati comprendono:

- Interpretare le espressioni facciali, le posture e le vocalizzazioni dei macachi.
- Come la vita sociale in grandi recinti arricchiti può far risparmiare tempo, spazio e denaro.
- Progettazione e realizzazione di programmi di arricchimento.
- Le migliori pratiche di allevamento, compreso il modo in cui affrontare l'asuefazione e l'addestramento per le diverse procedure.
- Indicatori comportamentali, fisiologici e di salute per valutare correttamente il benessere.

Per ulteriori informazioni visita il sito macaques.nc3rs.org.uk.

Valutazioni dell'arricchimento ambientale: aggiornamento del workshop e del webinar

Desideriamo ringraziare tutti coloro che hanno partecipato al workshop NC3Rs sulla valutazione dell'arricchimento ambientale al Congresso IAT 2023. Il 94% dei partecipanti che hanno fornito un feedback ha dichiarato di aver trovato la sessione estremamente utile o molto utile e il 100% raccomanderebbe il workshop ad altri guardiani di animali.

Per aiutarci a raggiungere un pubblico più ampio e consentirvi di imparare come affrontare le valutazioni dell'arricchimento, abbiamo organizzato un webinar ora disponibile online. La dottoressa Khia Dobbins (NC3Rs) ha condiviso alcune delle risorse disponibili per supportare i tecnici degli animali nella valutazione dell'arricchimento, mentre Zoe Windsor (Senior Research Support Technician e guardiano di animali, University College London) ha fornito indicazioni pratiche dal punto di vista dei tecnici.

Guardate la registrazione e leggete le domande e risposte della sessione nc3rs.org.uk/webinar-evaluations-environmental-enrichment.

Tradurre Tech3Rs

A partire dal numero 15 sono disponibili le traduzioni della newsletter Tech3Rs in francese, italiano e tedesco. Siamo grati al Centro svizzero di competenza 3R (3RCC) e alla Charité 3R per il loro lavoro di produzione di queste traduzioni, che ci permettono di aumentare la portata delle risorse per i tecnici animali in tutta Europa. I link alle versioni tradotte sono disponibili sul sito web dell'NC3Rs.


nc3rs.org.uk/tech3rs-newsletter.


3 R Swiss 3R
C C Competence
Centre



Le responsabili del programma regionale NC3Rs, dott.ssa Jessica Eddy e dott.ssa Laura McKillop, si confrontano con i partecipanti al workshop.

NC3Rs
Gibbs Building
215 Euston Road
London NW1 2BE

www.nc3rs.org.uk
tech3rs@nc3rs.org.uk
 @NC3Rs

www.swiss3RCC.org
info@swiss3rcc.org
 @Swiss3RCC