Rapporti ISTISAN

11/39

Sperimentazione animale: aspetti teorici, normativi e applicativi della nuova Direttiva europea 2010/63

ISSN 1123-3117

A cura di
A. Manciocco, E. Romano, F. Zoratto,
I. Branchi e A. Berry

www.iss.it

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Sperimentazione animale: aspetti teorici, normativi e applicativi della nuova Direttiva europea 2010/63

A cura di
Arianna Manciocco (a), Emilia Romano (b),
Francesca Zoratto (b), Igor Branchi (b) e Alessandra Berry (b)

(a) Dipartimento di Progettazione Molecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma
(b) Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

ISSN 1123-3117
Rapporti ISTISAN
11/39

Istituto Superiore di Sanità
Sperimentazione animale: aspetti teorici, normativi e applicativi della nuova Direttiva europea 2010/63.
A cura di Arianna Manciocco, Emilia Romano, Francesca Zoratto, Igor Branchi e Alessandra Berry
2011, 97 p. Rapporti ISTISAN 11/39

L'8 novembre 2010 il Parlamento europeo ha emanato la Direttiva 2010/63 sulla protezione degli animali impiegati per scopi scientifici, revisionando la Direttiva 86/609. In questo volume sono riportati i contributi dei docenti del Corso dal titolo "La nuova Direttiva europea 2010/63 sulla sperimentazione animale: aspetti teorici, normativi e applicativi" svolto il 26 e 27 maggio 2011 presso l'Istituto Superiore di Sanità. Seguendo lo schema del Corso, in questo volume inizialmente si fornisce una descrizione dettagliata della nuova normativa e si descrive il percorso che la normativa ha avuto in ambito europeo e l'impatto che tale legislazione avrà in Italia. Quindi, vengono affrontati gli aspetti etici, attraverso tematiche quali l'impiego dei primati non-umani, l'istituzione degli *Animal Welfare Bodies* e il punto di vista delle associazioni animaliste. Infine, il concetto delle "3R" (*Replacement, Reduction, Refinement*) viene trattato attraverso esempi pratici di rimpiazzo, raffinamento e riduzione del numero di animali impiegati, con particolare attenzione alle principali novità della Direttiva.
Parole chiave: Direttiva 2010/63; Sperimentazione animale; Benessere animale

Istituto Superiore di Sanità
Animal experimentation: theoretical, normative and practical issues of new European Directive 2010/63.
Edited by Arianna Manciocco, Emilia Romano, Francesca Zoratto, Igor Branchi and Alessandra Berry
2011, 97 p. Rapporti ISTISAN 11/39 (in Italian)

European Parliament has enacted the Directive 2010/63 on the protection of animals used in scientific experiments on the 8th September 2010, revisioning the Directive 86/609. This volume collects the contributions presented at a Course entitled "*La nuova Direttiva europea sulla sperimentazione animale: aspetti teorici, normativi e applicativi*" organized by the Istituto Superiore di Sanità on May 26-27, 2011 on the topic of the Directive 2010/63. In particular, following the organization of the course, firstly itemized description of normative is presented, with emphasis on the European scenario and its impact on the Italian legislation. Then, the ethical aspects, through the issue regarding non-human primate use, the theme of Animal Welfare Bodies and the considerations by animalist point of view, are dealt in. The second part of the present volume focused on "3R" concept (Replacement, Reduction, Refinement), with papers on alternative methods, refinement procedures and reduction possibilities. Finally, a particular attention to new aspects introduced by the Directive 2010/63 such as the regulation on the use of transgenic mice, the innovation of severity criteria, is given.
Key words: Directive 2010/63; Animal experimentation; Animal welfare

Si ringrazia il progetto MIUR "Biodiversità urbana del III Millennio: distinguere, osservare, forse tollerare, le specie aliene in Italia".

Per informazioni su questo documento scrivere a: arianna.manciocco@iss.it; alessandra.berry@iss.it.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:
Manciocco A, Romano E, Zoratto F, Branchi I, Berry A (Ed.). *Sperimentazione animale: aspetti teorici, normativi e applicativi della nuova Direttiva europea 2010/63*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011. (Rapporti ISTISAN 11/39).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione*: Paola De Castro, Sara Modigliani* e *Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© *Istituto Superiore di Sanità 2011*
viale Regina Elena, 299 – 00161 Roma

INDICE

Introduzione
Enrico Alleva 1

La nuova Direttiva europea 2010/63
Gianluca Panzini 3

Percorso della nuova Direttiva 2010/63/UE e scenario europeo
Andrea Dionisi 9

Significato e conseguenze della Direttiva europea 2010/63/UE per l'Italia
Giovanni Botta 14

Uso dei primati nella ricerca scientifica alla luce della nuova Direttiva
Gemma Perretta 20

Evoluzione dei comitati etici
Emanuela D'Amore e Paolo Coluccio 27

Associazioni protezionistiche e nuova legislazione
Michela Kuan 32

Iter procedurale per la validazione delle metodiche alternative
Isabella De Angelis 37

Evoluzione del principio delle 3R
Augusto Vitale 44

Direttiva 2010/63: conseguenze per il ruolo del medico veterinario
Fabio Faiola 51

Direttiva europea 2010/63 e impiego dei pesci nella ricerca biomedica
Arianna Manciocco 60

Gli animali geneticamente modificati nella nuova Direttiva europea 2010/63
Alessandra Berry e Igor Branchi 72

Progetto EATRIS:
il benessere animale nella prospettiva della ricerca traslazionale
Gemma Calamandrei 78

Criteri di severità delle procedure sperimentali nella nuova
Direttiva europea 2010/63/UE
Ana Criado e Alessia Ferrara 84

Direttiva 2010/63 e impatto su allevamento e produzione degli animali
da laboratorio
Emanuele Cesana 92

Impatto della nuova Direttiva europea sulla sperimentazione tossicologica
Germano Oberto 94

INTRODUZIONE

Enrico Alleva
Direttore, Reparto di Neuroscienze comportamentali, Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ha svolto da moltissimo tempo un ruolo centrale, a livello nazionale, relativamente a tematiche di bioetica della sperimentazione animale, zooantropologiche e antrozoologiche (1-5).

Alla fine degli anni '70 ebbi personalmente a farmi promotore di un Comitato Etico intramurale ISS, iniziativa che emerse in seguito ad analoghe realtà che proprio in quei mesi prendevano forma in alcuni Paesi scandinavi. Del gruppo facevano parte Amilcare Carpi De Resmini farmacologo cardiovascolare dell'ISS, Ernesto Capanna dell'Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Roma "La Sapienza", Luigi Boitani zoologo dei vertebrati della stessa Università ed Elisabetta Visalberghi.

In seguito, con la creazione della Commissione di Bioetica del Consiglio Nazionale delle Ricerche presieduto da Ermelando Vinicio Cosmi, venne elaborato un successivo documento, essenzialmente realizzato grazie al neuropsicologo ISS Giorgio Bignami, ai primatologi Elisabetta Visalberghi e Augusto Vitale e allo cter ISS Luigi Amorico. Quest'ultimo con Angelina Valanzano ne promosse la diffusione a livello nazionale, azione che poi servì ad alcune società scientifiche per compiere delle ricognizioni su specie vertebrate impiegate dai propri socie e sulla classificazione del grado di sofferenza specie-specifica.

Su input dell'allora Direttore ISS Francesco Pocchiari, assieme al biologo e veterinario Agostino Macrì, redigemmo un saggio-documento sulla sperimentazione animale che faceva seguito ad analoghe iniziative della generazione di Carpi e Silvio Garattini dell'Istituto Mario Negri. Inoltre, l'impegno personale mio e di altri, tra cui quello di Elisabetta Visalberghi, proseguì in quegli anni con interventi regolari anche sulla stampa italiana ("Il sogno impossibile di mondi perfetti", La Stampa 07/02/1990, "Gli animali servono davvero?", La Stampa 23/05/1990).

Ma un ruolo importante l'Istituto Superiore di Sanità lo ebbe nella fase di discussione e soprattutto di traduzione in lingua italiana della precedente Direttiva 86/609. Con Rodolfo Lorenzini, direttore del Servizio Biologico per la Gestione della Sperimentazione Animale, e personaggi quali Garattini, Michele Carrubba e Paolo Preziosi e una dozzina di altri esperti, lavorammo intensamente al Ministero della Sanità, sotto l'attivo e attento coordinamento generale di Romano Marabelli, sull'interpretazione dei termini *pain, suffering* e *distress*, sui quali psicobiologi, etologi e psicologi del comportamento ebbero allora e tuttora a discutere.

L'anno 2013 sarà un anno importante, ravvedendo ormai la Direttiva 63/2010, dopo l'esperienza decennale nel Regno Unito, la necessità di estendere alcuni livelli di protezione bioetica a invertebrati quali i Cefalopodi. Su questa tematica sono attive interazioni finalizzate alla redazione di lineeguida tra l'ISS, la Stazione Zoologica Anton Dohrn e il CNR. Per quanto riguarda specie di vertebrati "inferiori" come i pesci teleostei e invertebrati quali i crostacei decapodi, rimandiamo a recenti contributi sulla nostra rivista istituzionale e che saranno oggetto di future pubblicazioni nelle Serie edite dall'ISS.

I rapporti tra specie umana e altre specie viventi senzienti connotano il grado di civiltà delle varie popolazioni umane. Le comunità scientifica dei continenti e Paesi che, con le loro assai diverse e non di rado divergenti sensibilità legate alle singole discipline e sotto discipline, hanno risposto e reagiranno in maniera diversificata all'implementazione di regole talora neppure facili da essere comprese nel loro intento tecnico e bioetico.

L'ISS con questa sua storia e per il ruolo centrale che occupa a livello nazionale, resta la sede ideale per un confronto che renda la comunità nazionale partecipe e attiva verso tematiche così delicate agli occhi del cittadino europeo e non solo.

Bibliografia

1. Alleva E, Vitale A. We urgently need more data to improve the lives of laboratory animals. *Nature* 2000;405:116.
2. Alleva E, Francia N. Hunting, fishing, and trapping: falcons, hawks, and nocturnal birds of prey. In: Bekoff M. (Ed.). *Encyclopaedia of Human-Animal Relationships.* Colorado USA: Greenwood Press; 2007, Vol. 3, pp. 961-64.
3. Alleva E, Francia N. Zoos and acquariums: reptiles and zookeepers. In: Bekoff M. (Ed.). *Encyclopaedia of Human-Animal Relationships.* Colorado USA: Greenwood Press; 2007, Vol. 4, pp. 1360-1362.
4. Manciocco A Vitale A. *Legislazione e cura degli animali sperimentali: situazione attuale e prospettive future.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. Rapporti ISTISAN 07/16.
5. Vitale A Laviola G 1998. *Aspetti applicativi della sperimentazione animale: il confronto con il decreto legislativo n. 116/1992*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1998. Rapporti ISTISAN 98/28.

LA NUOVA DIRETTIVA EUROPEA 2010/63

Gianluca Panzini
Servizio Biologico e per la Gestione della sperimentazione Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il Parlamento Europeo e il Consiglio dell'Unione Europea hanno adottato in data 22 settembre 2010 la Direttiva 2010/63/UE, riguardante la protezione degli animali utilizzati a fini scientifici; l'adozione di tale Direttiva, che è composta da 66 articoli e 8 allegati, risultava necessaria al fine di adattare al continuo progresso scientifico e tecnologico la legislazione europea, che per quanto riguarda tale settore era rappresentata fino a quel momento dalla Direttiva del Consiglio del 24 novembre 1986, concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati Membri relative alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici (86/609/CEE). Come si può notare tra l'adozione delle due direttive europee sono trascorsi quasi 24 anni, in cui le conoscenze nel settore della scienza degli animali da laboratorio si sono notevolmente ampliate; risultava pertanto indispensabile che il divario esistente tra la legislazione vigente in Europa e le nuove acquisizioni scientifiche venisse colmato. Gli stati membri, come stabilito dalla Direttiva 2010/63/UE all'articolo 61, dovranno pertanto applicare le nuove disposizioni legislative a partire dal 1° gennaio 2013.

In questo elaborato verranno evidenziate le differenze più salienti tra il Decreto legislativo 116/1992, che ha recepito in Italia la Direttiva europea 86/609/CEE e che attualmente regolamenta la sperimentazione animale nel nostro Paese, e la Direttiva 2010/63/UE, il cui recepimento modificherà sicuramente la gestione e l'attuazione della sperimentazione animale nel nostro Paese, esigendo sia da parte dell'Autorità Regolatoria sia da parte dei ricercatori responsabili dei protocolli di ricerca un adattamento alle nuove regole.

Il primo cambiamento imposto dalla Direttiva 2010/63/UE riguarda le specie animali contemplate e il loro relativo stadio di sviluppo. Infatti, oltre a comprendere, così come il Decreto legislativo 116/1992, tutti i vertebrati vivi non umani e le loro forme larvali autonome, la Direttiva 2010/63/UE tutela sia le forme fetali di mammifero, a partire dall'ultimo terzo del loro sviluppo, sia i cefalopodi vivi. Come ribadito nelle considerazioni che precedono gli articoli della Direttiva, oltre ai vertebrati, che comprendono i ciclostomi, si è ritenuto opportuno includere nella Direttiva anche i cefalopodi poiché vi sono chiare evidenze scientifiche che essi possano provare dolore, sofferenza e angoscia. Lo stesso concetto è valido per le forme fetali di mammifero poiché, come sottolineato al punto 9 delle sopracitate considerazioni, è scientificamente dimostrato che nell'ultimo terzo del loro sviluppo essi possono provare dolore e che tale fatto possa ripercuotersi negativamente sulle fasi successive del loro sviluppo. Deve inoltre essere ricordato che la Direttiva 2010/63/UE include anche le procedure effettuate prima dell'ultimo terzo della gravidanza, nel caso in cui queste vengano prolungate includendo anche l'ultimo terzo e possano quindi in questo periodo essere causa di dolore e di sofferenza per i feti. Deve essere sottolineato, a questo punto, che la Direttiva non fa alcun riferimento agli embrioni degli uccelli che, come ad esempio l'embrione di pollo, sono usati nella ricerca scientifica e nell'ultimo periodo prima della schiusa potrebbero anche'essi provare sofferenza.

Per quanto attiene all'ambito di applicazione, la Direttiva 2010/63/UE, ugualmente a quanto stabilito attualmente dalla normativa vigente, esclude tanto le pratiche agricole, effettuate nelle aziende, quanto le pratiche veterinarie eseguite in clinica nel caso in cui esse non perseguano scopi sperimentali. La Direttiva 2010/63/UE stabilisce inoltre che non debbano rientrare sotto il proprio controllo le sperimentazioni veterinarie che si rendono necessarie per autorizzare

l'immissione in commercio di farmaci veterinari. A questo punto si deve ora sottolineare che, mentre il Decreto legislativo 116/1992 classifica in modo generico come "esperimento" qualsiasi utilizzo degli animali in grado di causare dolore, sofferenza, angoscia o danni durevoli, la Direttiva 2010/63/UE, sempre nell'articolo 1, decreta che tale classificazione non si applica a quelle "procedure" che causano un dolore inferiore a quello provocato dall'inserimento di un ago conformemente alle buone prassi veterinarie, stabilendo così una soglia più oggettiva per la valutazione del dolore, che risulta al contempo uno degli aspetti più complessi da quantificare e uno dei parametri principalmente analizzati dall'Autorità Regolatoria prima del rilascio dei permessi necessari per l'esecuzione di esperimenti su animali.

All'articolo 2 della Direttiva 2010/63/UE viene consentito che gli Stati Membri dell'Unione possano applicare misure più restrittive relativamente all'applicazione della Direttiva stessa, purché vengano rispettate le disposizioni della Versione Consolidata del Trattato sul Funzionamento Europeo del 9 maggio 2008. Tale Trattato, nell'articolo 13, ribadisce infatti che nell'attuazione delle politiche (agricoltura, pesca, ricerca e sviluppo, ecc.) l'Unione e gli Stati membri tengono pienamente conto delle esigenze in materia di benessere degli animali in quanto esseri senzienti, rispettando nel contempo le disposizioni legislative o amministrative e le consuetudini degli Stati membri per quanto riguarda, in particolare, i riti religiosi, le tradizioni culturali e il patrimonio regionale. A tale proposito viene riaffermato che uno Stato Membro dell'Unione, che abbia deciso di recepire la Direttiva europea in modo più restrittivo, non può vietare all'interno del proprio territorio la fornitura di animali provenienti da altri Stati membri in cui la Direttiva sia stata recepita senza l'apporto di modifiche.

All'articolo 3 viene fornita la definizione di "procedura" che rappresenta qualsiasi utilizzo di animali a fini sperimentali, scientifici ed educativi che possa provocare un dolore equivalente o superiore a quello provocato dall'inserimento di un ago conformemente alle buone prassi veterinarie. In questo articolo, come stabilito in precedenza nell'articolo 1 a proposito dell'ambito di applicazione, viene nuovamente rimarcato il limite di sofferenza a partire dal quale l'utilizzo di animali è contemplato dalla Direttiva 2010/63/UE. In questo articolo il termine di procedura viene anche esteso alla nascita di un animale o alla creazione di animali geneticamente modificati, allorché ciò sia causa di sofferenza per gli animali stessi; mentre anche il Decreto legislativo 116/1992 considera esperimento la nascita di un animale in condizioni di dolore, esso non fa alcun riferimento al mantenimento di colonie geneticamente modificate portatrici di un fenotipo sofferente; lo specifico riferimento ad animali geneticamente modificati da parte della Direttiva 2010/63/UE si è quindi reso necessario, poiché durante il lungo periodo intercorso tra l'approvazione delle due direttive europee vi è stato un incremento notevole di ceppi murini transgenici, *knock out* o *knock in* che sono stati creati al fine di essere utilizzati come modelli animali di una vastissima gamma di malattie.

È interessante notare a questo punto che la Direttiva 2010/63/UE non considera invece come procedura il semplice sacrificio di animali al fine di utilizzarne gli organi e/o i tessuti; attualmente la soppressione di animali con metodi umanitari per il prelievo di organi è regolamentata dal Decreto legislativo 116/1992 ed è soggetta a regime di comunicazione ai sensi dell'articolo 7; si presume pertanto che il recepimento della Direttiva dovrà fare in modo di includere nel suo ambito anche il semplice sacrificio di animali i cui organi saranno usati a fini scientifici. Tra le varie definizioni risulta infine doveroso citare quella di "progetto", che la Direttiva 2010/63/UE considera come "un programma di lavoro con un preciso obiettivo scientifico che prevede il ricorso a una o più procedure". All'articolo 4 la Direttiva 2010/63/UE fa un chiaro riferimento al principio delle 3R, il cui significato è *replacement, reduction* and *refinement* (sostituzione, riduzione e perfezionamento), richiedendo ai ricercatori il rispetto di tale principio durante l'esecuzione di attività sperimentali su animali; il Decreto legislativo 116/1992, pur non citando esplicitamente il principio delle 3R, richiede comunque l'impiego di

metodiche alternative se esistenti, l'utilizzo del numero minimo di animali tramite il quale sia possibile il raggiungimento degli obiettivi scientifici stabiliti, la stabulazione e il mantenimento degli animali in condizioni il più possibile rispondenti a quelle della specie oggetto della sperimentazione e la riduzione, ove possibile, del dolore, della sofferenza e dell'angoscia.

Nell'articolo 5 vengono invece elencate le motivazioni per le quali risulta possibile fare ricorso all'impiego di animali. Si evidenzia chiaramente che la maggior parte delle finalità scientifiche per le quali è permesso l'impiego di animali sono coincidenti con quelle del Decreto legislativo 116/1992 e sono rappresentate: a) dallo sviluppo, dalla produzione e dal controllo sulla sicurezza di farmaci o altri prodotti, destinati alla profilassi, alla prevenzione e alla cura delle malattie dell'uomo, degli animali e delle piante; b) dalla valutazione delle condizioni fisiologiche dell'uomo, degli animali e delle piante e c) dalla protezione dell'ambiente nell'interesse della salute dell'uomo e degli animali. La Direttiva 2010/63/UE, riferendosi al benessere animale, contempla inoltre le eventuali sperimentazioni effettuate allo scopo di migliorare le condizioni di produzione, per gli animali allevati a fini agronomici, dimostrando una sempre maggior sensibilità nei confronti delle condizioni in cui le specie animali da reddito vengono mantenute negli allevamenti intensivi. La Direttiva 2010/63/UE inoltre cita tra le finalità sia la ricerca di base, sia quella applicata e traslazionale.

Per quanto concerne la ricerca di base non è imposto alcun tipo di vincolo alla sua esecuzione, a differenza del Decreto legislativo 116/1992 che ne consente l'esecuzione unicamente nel caso in cui essa sia propedeutica per l'ottenimento di dati relativi: a) allo sviluppo, produzione e controllo sulla sicurezza di farmaci o altri prodotti, destinati alla profilassi, prevenzione, cura delle malattie dell'uomo, degli animali e delle piante; b) alla valutazione delle condizioni fisiologiche dell'uomo, degli animali e delle piante e c) alla salvaguardia dell'ambiente. La Direttiva 2010/63/UE cita inoltre tra le proprie finalità la conservazione delle specie animali e la didattica. A tal proposito, la Direttiva 2010/63/UE, a differenza del Decreto legislativo 116/1992, che all'articolo 8 fa riferimento a un generico scopo didattico, entra maggiormente nello specifico riferendosi a "insegnamento superiore o formazione ai fini dell'acquisizione, del mantenimento o del miglioramento di competenze professionali". La Direttiva 2010/63/UE fa infine riferimento all'utilizzo di animali per indagini medico-legali.

All'articolo 6 vengono descritti i metodi di soppressione. A tale riguardo, mentre il Decreto legislativo 116/1992 sancisce che la soppressione dell'animale debba essere effettuata con metodi umanitari in modo da causare, in relazione alla specie animale, la minore sofferenza possibile, la Direttiva 2010/63/UE, oltre a ribadire questo principio, fornisce nell'allegato IV la lista dei metodi di eutanasia più idonei per le diverse specie animali e stabilisce inoltre che l'eutanasia degli animali debba essere effettuata da personale competente negli stabilimenti allevatori, fornitori o utilizzatori. È comunque consentita una deroga a tali disposizioni nel caso di ricerche effettuate sul campo, o qualora la soppressione dell'animale debba essere effettuata in condizioni di emergenza.

L'impiego di animali a rischio di estinzione, in accordo a quanto stabilito sia dalla Direttiva 2010/63/UE che dal Decreto legislativo 116/1992, è concesso unicamente nel caso in cui la specie utilizzata sia l'unica che consente di acquisire informazioni medico-scientifiche essenziali, o nel caso in cui le ricerche si prepongano come fine la salvaguardia e la conservazione della specie oggetto della sperimentazione.

Nell'articolo 8 viene trattato l'utilizzo dei primati nella ricerca biomedica, affermando, così come nel Decreto legislativo 116/1992, che il loro utilizzo è possibile unicamente quando non sia possibile ottenere i medesimi risultati attraverso l'impiego di altre specie animali.

All'articolo 9 della Direttiva 2010/63/UE viene vietato l'impiego nella sperimentazione degli animali selvatici. È comunque ammessa una deroga unicamente nel caso in cui sia

scientificamente provata l'impossibilità di ottenere i medesimi risultati utilizzando animali provenienti da allevamenti.

Nell'articolo 10, si fa riferimento agli animali allevati per essere impiegati nella sperimentazione, rimandando all'allegato I e affermando che gli animali elencati in tale allegato "possano essere utilizzati unicamente nelle procedure per le quali sono stati allevati". Tale allegato cita le seguenti specie animali: topo (*Mus musculus*), ratto (*Rattus norvegicus*), porcellino d'India (*Cavia porcellus*), criceto siriano (*Mesocricetus auratus*), criceto cinese (*Cricetulus griseus*), gerbillo della Mongolia (*Meriones unguiculatus*), coniglio (*Oryctolagus cuniculus*), cane (*Canis familiaris*), gatto (*Felis catus*), tutte le specie di primati non umani, rana [Xenopus (*laevis*, *tropicalis*), Rana (*temporaria*, *pipiens*)] e pesce zebra (*Danio rerio*). Rispetto all'allegato I del Decreto legislativo 116/1992, sono stati aggiunti il criceto cinese, il gerbillo della Mongolia, le 4 specie di rane e il pesce zebra, probabilmente a causa di un loro sempre maggiore utilizzo nella sperimentazione, mentre la quaglia (*Coturnix coturnix*) è stata eliminata dall'elenco forse a causa delle difficoltà di reperire stabilimenti fornitori per la sperimentazione.

L'articolo 11 vieta l'utilizzo degli animali randagi e selvatici appartenenti alle specie domestiche, consentendo tuttavia una deroga nel caso in cui gli studi abbiano come finalità la salute e il benessere di tali animali o riguardino gravi minacce per l'ambiente, l'uomo o gli animali. Attualmente l'utilizzo dei randagi risulta vietato perché, come ricordato in precedenza, il Decreto legislativo 116/1992 include il cane e il gatto tra le specie animali che possono essere usate per finalità sperimentali solo a condizione che provengano da stabilimenti allevatori; inoltre, a seguito di un'analisi delle motivazioni per le quali l'utilizzo dei randagi può essere concesso, risulta evidente di come si tratti di una eventualità assai remota.

Per quanto riguarda l'impiego dell'anestesia, le disposizioni della Direttiva 2010/63/UE e del Decreto legislativo 116/1992 sono simili, si sottolinea tuttavia il riferimento della Direttiva 2010/63/UE all'obbligatorietà, sempre compatibilmente con le finalità dell'esperimento, dei trattamenti analgesici post-operatori qualora gli animali siano sottoposti a interventi chirurgici per ragioni sperimentali.

Altro aspetto interessante è la classificazione della gravità delle procedure a cui fa riferimento l'articolo 15 della Direttiva 2010/63/UE; le procedure in questo articolo vengono classificate in quattro gruppi, "non risveglio", "lievi", "moderate" e "gravi", di cui una serie di esempi vengono forniti dall'allegato VIII. Risulta chiara l'importanza di questa classificazione quando si deve decidere se un protocollo di ricerca sia soggetto a regime di comunicazione ai sensi dell'articolo 7 del Decreto legislativo 116/1992 o di autorizzazione ai sensi degli articoli 8 e 9 dello stesso decreto. Infatti, la misurazione del dolore è attualmente un punto al contempo dirimente e, entro certi limiti, soggettivo poiché legato alla sensibilità individuale. A tale riguardo è evidente che una lista di procedure possa fornire un valido aiuto sia ai ricercatori che stilano i protocolli, sia all'Autorità Regolatoria, che è preposta alla valutazione dei protocolli medesimi.

Gli animali, secondo quanto stabilito dall'articolo 16 possono essere riutilizzati a condizione che la prima procedura sia classificata come "lieve" o "moderata", che lo stato di salute e di benessere dell'animale sia stato completamente ristabilito e che la procedura successiva sia classificata come "lieve", "moderata" o "non risveglio". In casi eccezionali lo stesso articolo prevede che un animale, dopo essere stato visitato da un medico veterinario, possa essere riutilizzato a condizione che esso non sia sottoposto più di una volta a una procedura che comporti "intenso dolore, angoscia o sofferenza equivalente". Come già precedentemente rimarcato, si sottolinea nuovamente l'importanza dell'aiuto fornito da una lista di procedure divisa per gravità nel caso in cui debba essere deciso il riutilizzo di un animale. Attualmente il Decreto legislativo 116/1992 stabilisce che gli animali non possano essere utilizzati più di una volta in esperimenti che provochino "intenso dolore, angoscia o sofferenza equivalente", lasciando comunque agli

sperimentatori, entro certi margini, una maggiore libertà decisionale. Per quanto riguarda la fine della procedura, contemplata dall'articolo 17, essa viene definita non solamente come il termine della necessità di effettuare nuove osservazioni, ma anche, riferendosi agli animali geneticamente modificati, come il momento in cui non è più previsto per la discendenza un dolore equivalente o superiore a quello provocato dall'inserimento di un ago.

Altri aspetti interessanti della Direttiva sono la definizione di programmi per l'eventuale condivisione tra i diversi Stati membri degli organi e dei tessuti degli animali soppressi, come stabilito dall'articolo 18, e la possibilità di reinserire gli animali, una volta ultimate le procedure sperimentali, e a condizione che lo stato di salute degli animali stessi lo permetta e che non sussistano rischi per la sanità pubblica, in un habitat o in sistemi di allevamento adeguati.

Infine saranno analizzati in questo elaborato gli aspetti della Direttiva 2010/63/UE legati all'autorizzazione dei progetti. Come previsto dall'articolo 36 per la realizzazione di un progetto risulta necessario disporre di una autorizzazione e di una valutazione dell'Autorità competente. Viene tuttavia permesso agli Stati membri di introdurre una procedura amministrativa semplificata, come spiegato nel successivo articolo 42, nel caso in cui le procedure siano classificate come "non risveglio", "lievi"o "moderate", non utilizzino primati non umani che sono necessari per soddisfare requisiti regolatori, o utilizzano animali a fini di produzione o diagnostici con metodi prestabiliti.

La domanda del progetto deve contenere la proposta del progetto, una sintesi non tecnica del progetto e una serie di informazioni elencate nell'allegato VI, quali la specie, il numero, l'origine e le fasi della vita degli animali, la descrizione delle procedure, il ricorso ai metodi di sostituzione, riduzione o perfezionamento, l'impiego di anestetici e antidolorifici, l'uso di punti finali umanitari, l'eventuale riutilizzo degli animali, la classificazione della gravità delle procedure, le condizioni di stabulazione, i metodi di soppressione e la competenza del personale incluso nel progetto. Ai sensi dell'articolo 38, per la concessione dell'autorizzazione devono essere valutati gli obiettivi del progetto, l'applicazione del principio delle 3R, la gravità delle procedure e il rapporto tra i danni provocati agli animali e i benefici attesi dalla sperimentazione; sempre ai sensi del medesimo articolo l'Autorità competente valuta l'opportunità di effettuare una valutazione retrospettiva del progetto e questo fatto rappresenta un aspetto innovativo rispetto alla normativa vigente che non richiede attualmente nessun controllo sui risultati ottenuti una volta terminata la sperimentazione. La suddetta analisi retrospettiva ha il compito di valutare se gli obiettivi del progetto siano stati raggiunti in rapporto al numero e alla specie degli animali impiegati e alla gravità delle procedure attuate. La valutazione retrospettiva è sempre obbligatoria nelle sperimentazioni che comportano l'uso di primati non umani, o l'applicazione di procedure classificate come gravi.

L'articolo 40 della Direttiva 2010/63/UE afferma che le autorizzazioni non possano essere concesse per un periodo superiore a 5 anni, a differenza del Decreto legislativo 116/1992 che attualmente limita a 3 anni il periodo massimo di validità di una autorizzazione. L'articolo 41 della Direttiva 2010/63/UE stabilisce che la decisione riguardante l'autorizzazione debba pervenire al richiedente entro 40 giorni lavorativi dal ricevimento della domanda; infine, in casi di particolare complessità, l'Autorità competente può prorogare una volta soltanto il suddetto periodo di ulteriori 15 giorni lavorativi. Da quanto esposto si evince che il recepimento italiano della nuova Direttiva europea apporterà sicuramente svariate modifiche al settore della sperimentazione animale in Italia, facilitando alcuni aspetti, quali la valutazione del dolore, il lavoro degli sperimentatori e delle Autorità Regolatorie, ma richiedendo al contempo maggiori sforzi a livello di controllo in relazione, ad esempio, al maggior numero di specie animali incluse nella Direttiva stessa o alle disposizioni riguardanti gli animali geneticamente modificati.

Bibliografia

Commissione Europea. Direttiva 86/609/CEE del Consiglio del 24 novembre 1986 concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati Membri relative alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L358:1-28.

Comunità Europea. Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L1276 del 20 ottobre 2010.

Comunità Europea. Versione Consolidata del Trattato sul Funzionamento dell'Unione Europea. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* C 115 del 9 maggio 2008.

Italia. Decreto Legislativo 27 gennaio 1992 n.116. Attuazione della Direttiva n. 86/609/CEE in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale - Supplemento Ordinario* n. 40 del 18 febbraio 1992.

PERCORSO DELLA NUOVA DIRETTIVA 2010/63/UE E SCENARIO EUROPEO

Andrea Dionisi
Rappresentanza Permanente d'Italia presso l'Unione Europea, Bruxelles

Ogni anno nell'Unione Europea (EU), che si compone attualmente di 27 Stati Membri, vengono impiegati circa 12 milioni di animali nelle procedure scientifiche, secondo i dati che risultano in possesso alla Commissione europea.

Le segnalazioni e petizioni ricevute dai servizi della Commissione e i sondaggi effettuati tramite l'EUROBAROMETRO hanno fatto emergere una chiara indicazione sulla necessità di modificare le attuali politiche in materia di tutela degli animali nella sperimentazione e di fare tutto il possibile per ridurrre al minimo il numero negli esperimenti. La partecipazione a recenti sondaggi e consultazioni pubbliche è un forte segnale dell'interesse dimostrato dal pubblico per questo settore: due delle tre più ampie consultazioni pubbliche mai tenute dalla Commissione europea sulle proprie attività politiche hanno riguardato il benessere degli animali [*].

Probabilmente l'approccio più pragmatico per venire incontro a tali esigenze e diminuire il numero degli animali utilizzati nella sperimentazione si basa sull'introduzione progressiva di metodi alternativi.

La linea è stata condivisa, sebbene con vari distinguo dettati sia dall'esigenza di conciliare il rispetto del benessere animale e lo sviluppo della ricerca, dagli esecutivi degli Stati Membri, per garantire la maggior protezione e il miglior benessere possibile agli animali che vengono lecitamente usati, preservando gli scopi dell'esperimento e il suo corretto svolgimento.

La Direttiva 86/609/CEE (1) ha costituito fino a poco tempo fa il più importante atto legislativo della Comunità europea volto ad armonizzare le norme degli Stati membri per la protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. Il documento, adottato nel 1986, non aveva mai subito sostanziali modifiche. Dall'adozione della Direttiva 86/609/CEE sono stati compiuti considerevoli progressi nelle tecniche sperimentali ed emersi nuovi dati scientifici sulla capacità degli animali di provare dolore e sofferenza. L'inadeguatezza del testo era chiarae le disposizioni della Direttiva non tenevano sufficientemente conto dei risvolti etici dell'uso degli animali negli esperimenti, non facendo neanche esplicito riferimento né garantendo la piena applicazione del principio "delle tre R" (Replacement, Reduction and Refinement), benché questo sia ora accettato come il principio cardine in questo settore da tutte le parti in causa.

Tali lacune nelle norme comunitarie sono state ovviate da alcuni Stati membri, oltrepassando le disposizioni della Direttiva, in fase di recepimento del testo nei dispositivi giuridici nazionali. L'adozione di norme nazionali più restrittive ha prodotto un contesto concorrenziale fortemente diversificato e difforme per le imprese e i ricercatori, contravvenendo all'obiettivo della Direttiva di armonizzare il sistema nell'UE e di evitare la frammentazione del mercato interno.

Il testo della vecchia Direttiva, che riprendeva quasi alla lettera quello di una convenzione internazionale, aveva generato disposizioni non chiare, incoerenze e ambiguità, provocando problemi di recepimento nelle norme nazionali.

[*] La consultazione sul programma d'azione comunitario per la protezione e il benessere degli animali ha ricevuto 44.514 risposte e quella sulla revisione della Direttiva 86/609/CEE ha ricevuto 42.655 risposte.

I problemi che emergevano dall'analisi politica effettuata erano principalmente di quattro ordini: scientifici, economici, pubblici/sociali e relativi al benessere degli animali.

I problemi scientifici erano legati alla scarsa innovazione e a una conoscenza scientifica non sufficiente alle esigenze in materia. Questo panorama era connesso ai ritardi nell'attuazione dei progetti, a scarsi incentivi allo sviluppo e all'utilizzo di metodi alternativi, alla ripetizione potenzialmente inutile di esperimenti, al rischio di risultati variabili nella ricerca per la mancanza di controlli uniformi sulla concezione degli studi e sull'attuazione dei perfezionamenti e ad ostacoli alla libera circolazione dei ricercatori.

I problemi economici hanno afflitto il mercato nazionale e quello internazionale minacciando così l'integrità e il rispetto del concetto del mercato interno pilastro delle politiche comunitarie. Erano emersi chiaramente svantaggi concorrenziali per gli Stati Membri che applicavano standard elevati in materia di benessere degli animali dovuti principalmente alle differenze di regolamentazioni e da procedure e criteri di autorizzazione divergenti negli Stati membri. Questi avevano portato costi e ritardi variabili nell'attuazione dei progetti, condizioni lavorative non entusiasmanti per i ricercatori, ostacoli alla mobilità orizzontale, una crescente attitudine minacciosa ai limiti della legalità da parte degli attivisti estremisti e il lievitare dei costi della ricerca. Problemi che avevano coinvolto anche gli allevatori e i fornitori di animali a causa dell'aumento dei costi di sistemazione e cura.

I problemi pubblici/sociali si erano manifestati soprattutto a causa della crescente dissociazione tra una legislazione debole e una forte preoccupazione dell'opinione pubblica, che aveva come origine la riscoperta e presa d'atto dell'esigenza di rispettare i nuovi valori etici e sociali e il crescente interesse per l'accettabilità della sperimentazione animale.

I problemi legati al benessere degli animali, infine si riferivano ai diversi livelli diversi di benessere, derivati dalle diverse norme in vigore e dal numero relativamente elevato di animali non protetti dalla legislazione nazionale ed dalla diversa percezione del rispetto di tali regole.

Quest'ultimo, forse, rimane uno dei motivi fondamentali che ancora generano forti preoccupazioni e perplessità da parte degli Stati Membri sull'effettiva necessità di continuare ad applicare norme e regole sempre più evolute per il benessere animale. La diversa percezione e applicazione del benessere animale nei Paesi terzi comporta, infatti, sicuramente distorsioni di mercato a svantaggio dell'Unione Europea.

A tal proposito la Commissione è costantemente invitata dai Paesi UE a vigilare sulla corretta applicazione delle norme di benessere nei Paesi terzi. Il mancato rispetto delle norme comporta un aumento del differenziale dei costi di produzione, già generato di per sè da altre cause, che diventano insostenibili per garantire una corretta competitività a livello mondiale. Le discussioni negoziali tra l'UE e i Paesi terzi vertono sempre più sulla questione e la politica europea in tale settore è costantemente portata all'attenzione dei *fora* internazionali (Organizzazione mondiale del commercio-settore accordi sanitari e fitosanitari-SPS; Ufficio internazionale delle Epizozie-OIE; *Codex alimentarius*, ecc.).

Uno dei principali obiettivi della Commissione europea in questo settore era ed è anche quello di creare condizioni di parità per i ricercatori e le imprese.

Le basi scientifiche su cui poggiava la precedente Direttiva 86/609/CEE (1) risalgono a più di 25 anni fa. Alcune disposizioni erano ormai superate. La Direttiva non teneva più conto delle moderne tecniche nel campo della sperimentazione animale né incorporava i più recenti progressi nel settore del benessere degli animali.

Inoltre, il testo della Direttiva si basava su di una convenzione internazionale e, di conseguenza, alcune disposizioni avevano più carattere politico che normativo, benché ancora oggi quest'aspetto abbia enormi influenze nella negoziazione.

La Commissione ha dovuto tener conto dell'importanza sempre maggiore attribuita al benessere degli animali che si sta trasformando in preoccupazione etica per divenire un

"atteggiamento culturale" della società europea, come riconosciuto dal protocollo sulla protezione e il benessere degli animali del trattato UE, che considera gli animali esseri senzienti.

L'art. 13 del Trattato di Lisbona, che ha recentemente adeguato e aggiornato le precedenti versioni dei Trattati che indirizzano e codificano le politiche comunitarie (Roma, Amsterdam, Maastricht e Nizza) ora, infatti, impone alla Comunità e agli Stati membri l'obbligo di tenere pienamente conto del benessere animale, modalità che in precedenza avveniva in modo non del tutto soddisfacente.

In conformità agli obiettivi fissati del programma di Lisbona, emergeva anche l'obbligo di tenere in considerazione l'analisi dei costi e dei benefici potenziali dell'azione o dell'inazione e del rispetto dello sviluppo socio-economico nell'intera Comunità. L'obbligo prevedeva inoltre l'introduzione di misure specifiche che consentissero l'applicazione di procedure amministrative flessibili a sostegno degli obiettivi del programma di Lisbona. Tutto ciò doveva svolgersi mantenendo un equilibrio tra due aspetti: da un lato promuovere la ricerca e la competitività europea e, dall'altro, l'essere all'avanguardia nel tenere pienamente conto del benessere animale.

Esisteva anche l'esigenza di tenere in debita considerazione le prescrizioni e indicazioni contenute in altre norme e politiche comunitarie. Il regolamento (CE) n. 1907/2006 (REACH) (2), ad esempio, ha come effetto temporaneo un crescente uso degli animali nella sperimentazione, nonostante le norme già adottate per evitare sperimentazioni inutili. Anche per questo motivo, e alla luce delle disposizioni della Direttiva sui cosmetici, si è resa sempre più urgente la necessità di tentare di ridurre la dipendenza dalla sperimentazione animale, con l'obiettivo ultimo di sostituirla completamente.

La nuova norma doveva integrare inoltre pienamente il principio delle tre R in linea con altre politiche comunitarie. L'obbligo di sostituire, ridurre e perfezionare l'uso degli animali nelle procedure scientifiche è evidenziato in numerose altre normative comunitarie: Direttiva 98/8/CE sui biocidi (3), Direttiva 1999/45/CE sui preparati pericolosi (4), settima modifica della Direttiva 76/768/CEE (5) sui cosmetici oltre il già citato Regolamento REACH.

A testimonianza degli sforzi messi in campo per migliorare la situazione, già dal 1991, la Commissione ha istituito il Centro europeo per la convalida dei metodi alternativi (ECVAM) presso il Centro comune di ricerca della Commissione (Ispra). Le misure da questo proposte per promuovere procedure alternative variano dall'obbligo generale di utilizzare metodi alternativi non appena disponibili ad iniziative più concrete per favorirne lo sviluppo, la convalida e l'accettazione anche a livello internazionale. In linea generale, ciò è stato tenuto conto nella nuova Direttiva che impone ora di tenere pienamente conto del principio delle tre R nello sviluppo di qualsiasi misura comunitaria per tutelare la salute e la sicurezza dell'uomo, degli animali e dell'ambiente.

Nel proporre le nuove norme sono stati tenuti in considerazione altri validi motivi che giustificano la scelta di differenziare l'uso degli animali a seconda della specie di appartenenza, soprattutto in virtù della loro prossimità genetica con l'essere umano. Benché tale prossimità faccia di alcune specie di primati non umani le uniche adatte a determinati tipi di esperimenti, questa differenziazione è scientificamente fondata e doveva essere rispettata. Ciò ha portato, in linea con gli impegni precedentemente assunti, all'integrazione di disposizioni specifiche per ridurre al minimo l'uso dei primati non umani.

La nuova norma limita ora l'impiego di primati non umani e delle grandi scimmie circoscrivendo l'utilizzo di altre specie esclusivamente a specifici campi di applicazione e impone requisiti severi sull'origine degli animali, nonché meccanismi di monitoraggio per garantire l'efficacia delle misure proposte promovendo, in ultima analisi, la definitiva abolizione dell'uso dei primati non umani nelle procedure scientifiche. Si riconosce, tuttavia,

che le attuali conoscenze scientifiche non ci consentiranno di raggiungere l'obiettivo pienamente nel prossimo futuro.

Emerge chiaramente come i compiti e gli obiettivi che hanno caratterizzato i nuovi indirizzi affidati alla Commissione per la preparazione del nuovo atto legislativo siano stati particolarmente complicati e la sfida ardua.

Il compito non è stato reso sicuramente più semplice dalla consultazione obbligatoria che la Commissione ha affrontato con gli *stakeholders* (associazioni industriali, associazioni per il benessere degli animali, associazioni di pazienti, istituti scientifici e di ricerca, associazioni operanti per l'applicazione del principio delle tre R e dei metodi alternativi, l'Agenzia europea per i medicinali, il Centro comune di ricerca e altri servizi della Commissione, allevatori di animali da laboratorio di Paesi terzi, così come molte altre associazioni diffuse sul territorio europeo), il Parlamento Europeo e le varie Amministrazioni nazionali nelle fasi della prima stesura del testo e di negoziazione.

La difficoltà maggiore si è registrata durante la fase di discussione che si è tenuta all'interno del Consiglio, quindi tra Paesi membri dell'UE e poi in quella negoziale con il Parlamento europeo.

A livello di Consiglio, si è notata, con il progredire del dossier a livelli più elevati di discussione (Comitato dei Rappresentanti Permanenti-COREPER), l'assunzione da parte degli Stati Membri di posizioni sempre più politiche e meno tecniche. Il fronte degli Stati Membri si è frammentato mostrando sempre più apertamente un profondo divario tra le posizioni. Come conseguenza si sono formati "blocchi" di Paesi: quelli ultra difensivisti del benessere animale a tutti i costi, quelli per cui era necessaria una giusta mediazione tra le esigenze di benessere animale e ricerca e quelli per cui il mantenimento *tout-court* della ricerca assumeva un carattere prioritario rispetto alle esigenze del benessere animale.

Uno scenario simile si è ripetuto poi con la discussione all'interno del Parlamento Europeo dove, a differenza del Consiglio, la lobby industriale ha fatto sentire e valere maggiormente il proprio peso. Qui lo scenario, diviso tra i sostenitori del benessere e quelli a favore della ricerca, ha visto gli schieramenti formarsi secondo una logica "sistema Paese" piuttosto che tra gruppi politici secondo affinità ideologiche.

La sorpresa reale è emersa poi durante la fase negoziale tra le due Istituzioni (Parlamento europeo e Consiglio) dato che si tratta di un testo che prevede come base legale la co-decisione, che preludeva ad un possibile accordo per l'adozione definitiva del testo.

Qui l'abilità diplomatica e di *lobbying* di tre grandi Paesi ha portato ad un irrigidimento delle parti che ha rischiato di far saltare il possibile accordo, portando finalmente ad un compromesso che ha ridimensionato in modo evidente le aspettative su cui si basava la proposta iniziale della Commissione.

In particolare, sono state adottate clausole di salvaguardia, che permettono tuttora lo svolgimento di esperimenti scientifici anche su primati non umani e grandi scimmie secondo degli schemi e prescrizioni molto rigide. L'obiettivo primario e lo scopo di fondo, come hanno lamentato le Associazioni protezionistiche degli animali, è stato così infine ridimensionato. Ma lo spirito di compromesso che ha prevalso, ha comunque permesso di adottare un testo che contiene indubbie migliorie rispetto al passato e comunque senza il quale si rischiava di rimanere ancorati a norme obsolete fissate più di 25 anni fa.

Ma tutte le norme comunitarie sono pensate e adottate per risolvere problemi di fondo e contingenti. La solidità del diritto comunitario sta nella consapevolezza che le norme non sono scritte nella pietra e che una possibile revisione alla luce di nuove esigenze od a seguito dell'evoluzione delle conoscenze scientifiche è sempre da prevedere. La nuova Direttiva 2010/63/UE stabilisce chiaramente anche questa possibilità (6).

Spetta ora alla Commissione la grande responsabilità sia di assicurare la corretta applicazione della nuova norma dal punto di vista legislativo, sia di proporre nuovi studi scientifici che potranno essere la base per futuri cambiamenti del testo legislativo.

Sarà compito del Centro europeo ECVAM di Ispra sviluppare nuove ricerche e coordinare le attività scientifiche nel campo della sperimentazione con lo scopo di introdurre progressivamente l'obbligo di metodi alternativi all'uso degli animali nella sperimentazione.

Qui giocherà molto il ruolo degli Istituti di ricerca nazionali nel fornire adeguati supporti scientifici che potranno indirizzare le scelte sia per il centro di ricerca di Ispra che per formulare serene scelte politiche basate sulla scienza.

Nel quadro di questo scenario sarà di particolare aiuto anche l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) che fungerà da organo scientifico indipendente di valutazione, consulenza, informazioni e comunicazione sui rischi della Commissione europea. Nel mandato dell'EFSA rientrano, infatti, anche le questioni scientifiche sul benessere degli animali, che vengono affrontate dal gruppo di esperti scientifici sulla salute e il benessere degli animali (AHAW).

Bibliografia

1. Commisione Europea. Direttiva 86/609/CEE del Consiglio del 24 novembre 1986 concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati Membri relative alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L358:1-28.
2. Commissione Europea. Regolamento n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 18 dicembre 2006, concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la Direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la Direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* 30 dicembre 2006. L396: 1-279.
3. Commissione Europea. Direttiva 98/8/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 16 febbraio 1998 relativa all'immissione sul mercato dei biocidi. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* 24 aprile 1998. L123: 1-63.
4. Commissione Europea. Direttiva 1999/45/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 31 maggio 1999 concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative degli Stati membri relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura dei preparati pericolosi. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* 30 luglio 1999 L200: 1-68.
5. Commissione Europea. Direttiva 76/768/CEE del Consiglio, del 27 luglio 1976, concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri relative ai prodotti cosmetici e relativa settima modifica mediante la Direttiva 2003/15/CE. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* 27 settembre 1976 L262: 169-200.
6. Commissione Europea. Direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* 20 ottobre 2010 L276: 33-79.

SIGNIFICATO E CONSEGUENZE DELLA DIRETTIVA EUROPEA 2010/63/UE PER L'ITALIA

Giovanni Botta
Ministero della Salute, Roma

Premessa

Il 22 settembre 2010 è stata pubblicata la Direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (1), finalizzata al rafforzamento della protezione degli animali; essa tiene conto della sensibilità dell'opinione pubblica sulle tematiche riguardanti il benessere degli animali, riconosciuta anche dal protocollo sulla protezione e il benessere degli animali del trattato CE di Lisbona (2), che considera gli animali quali esseri viventi senzienti.

La Direttiva 2010/63/UE si propone quindi di assicurare, in tutta l'Unione europea, condizioni di parità per le imprese e per i ricercatori e incrementare la qualità della ricerca scientifica, rafforzando la protezione degli animali ancora usati nelle procedure scientifiche e fornendo un forte impulso per una maggiore promozione nello sviluppo, nella convalida, nell'accettazione e nell'applicazione di metodi alternativi per la piena applicazione del principio delle tre R (*Replacement, Reduction and Refinement* - sostituzione, riduzione e perfezionamento) nell'uso degli animali negli esperimenti con l'obiettivo finale della completa sostituzione delle procedure su animali vivi.

Contesto europeo e necessità di revisione

La precedente normativa, Direttiva 86/609/CEE (3), poggiava su acquisizioni scientifiche risalenti agli anni '80, quindi non più attuali, inoltre il testo, sottoposto a libera interpretazione, aveva generato distorsioni del mercato interno, con notevoli differenze di regolamentazione tra gli Stati membri.

Nel 2002, in una risoluzione sulla Direttiva 86/609/CEE, il Parlamento europeo invitava la Commissione a preparare una proposta di Direttiva "aggiornata", che prevedesse misure più rigorose e trasparenti nel settore della sperimentazione animale.

Sono da segnalare anche altri fattori, di seguito elencati, che rendono necessario un aggiornamento della Direttiva.

- Emanazione della Direttiva 2003/15/CE sui cosmetici, recepita con il DL.vo n. 50/2005 (4) che introduce il divieto di testare cosmetici finiti sugli animali, tale divieto è esteso, in date successive, per le prove tossicologiche sugli ingredienti o combinazioni di ingredienti, per la commercializzazione sul mercato comunitario di prodotti cosmetici e loro ingredienti testati sugli animali.
- Revisione delle regole sulla registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze e prodotti chimici con l'approvazione da parte del Parlamento europeo del Regolamento CE n.1907/2006, denominato Regolamento REACH, entrato in vigore il 1° giugno 2007 (5).

- La revisione e l'aggiornamento delle linee guida per una corretta stabulazione e cura degli animali contenute nell'Allegato A alla Convenzione del Consiglio d'Europa ETS 123 e approvata a Strasburgo nel giugno 2006 (6).
- La trasmissione al Parlamento Europeo e al Consiglio, da parte della Commissione UE, di un programma d'azione comunitario per la protezione e il benessere degli animali per gli anni 2006-2010 (*Community Animal Welfare Action Plan* 2006-2010) dove si evidenzia l'impegno della Commissione a realizzare un inventario chiaro e completo di tutte le iniziative progettate dalla Commissione stessa. Tra i principali obiettivi del *Community Animal Welfare Action Plan* 2006-2010 si segnalano quelli relativi ad una maggiore definizione e chiarezza delle politiche comunitarie sulla protezione e sul benessere degli animali, a promuovere un livello elevato di benessere degli animali nell'UE e in ambito internazionale e ad appoggiare il principio: "sostituzione, affinamento e riduzione", a promuovere metodi alternativi alla sperimentazione animale.

Nella formulazione della proposta si è tenuto conto dei pareri di esperti, di una consultazione pubblica su internet (2006), e degli studi per valutare l'impatto delle misure proposte a livello socioeconomico e sul benessere degli animali.

In generale si registrava un ampio consenso sulla necessità di rivedere la normativa, individuando nello strumento legislativo della Direttiva un meccanismo flessibile che consente agli Stati Membri sufficiente margine per l'attuazione di misure a livello nazionale e cercando allo stesso tempo di mantenere un equilibrio tra promozione della ricerca, competitività europea e benessere animale in linea con il principio di sussidiarietà secondo il quale "*l'Unione interviene soltanto se e in quanto gli obiettivi dell'azione prevista non possono essere conseguiti in maniera sufficiente dagli Stati membri, né a livello centrale né a livello regionale o locale, ma possono essere conseguiti meglio a livello di Unione*" (Articolo 3-ter del trattato di Lisbona). Lo strumento legislativo della Direttiva è conforme al principio di proporzionalità in quanto agli Stati membri è lasciato ampio margine di manovra per individuare le misure specifiche più adeguate a livello amministrativo che tengano conto delle rispettive infrastrutture amministrative e delle specificità locali e regionali inerenti agli aspetti etici e socio-economici.

È prevista la possibilità per gli Stati membri di prendere misure più rigorose di quelle stabilite nella Direttiva proposta, purché dette misure soddisfino le condizioni dell'articolo 95, paragrafo 4, del trattato CE.

Il 5 novembre 2008 la Commissione europea ha presentato una proposta di Direttiva riguardante la protezione degli animali impiegati ai fini scientifici (7) che è stata inviata al Parlamento Europeo e al Consiglio per l'approvazione con procedura di codecisione.

Nel maggio 2009 il Parlamento Europeo approva in prima lettura e con ampia maggioranza un testo modificato da 202 emendamenti che però non trova l'accordo della Commissione UE. È stato necessario un lungo e difficile lavoro di mediazione da parte del Consiglio per arrivare ad un testo di compromesso fra le tre istituzioni che viene finalmente approvato l'8 settembre 2010 dal Parlamento Europeo.

La Direttiva 2010/63/UE dovrà essere recepita dagli stati membri entro il 9 novembre 2012 e tali disposizioni entrano in vigore a partire da 1 gennaio 2013.

Contesto italiano

In Italia nei primi anni del 2000 è emersa la necessità di una profonda revisione della legislazione nazionale sulla sperimentazione animale, ritenuta inadeguata al progresso scientifico, all'aumentata sensibilità dell'opinione pubblica sugli aspetti di protezione degli animali e in coerenza con quanto accadeva a livello europeo.

Il lavoro di revisione, iniziato nel 2003, è stato portato avanti da un comitato composto da diverse personalità e organizzazioni, provenienti sia dal mondo protezionistico sia dal mondo scientifico e si è concretizza con la presentazione al Parlamento di un Progetto di Legge (PdL 5444/2005). Lo stesso testo è stato ripresentato nelle due successive legislature (XV legislatura con l'Atto Senato 258/2006 e XVI legislatura con l'Atto Senato 53/2008).

Tra il testo presentato in Parlamento e il testo legislativo della nuova Direttiva ci sono molti punti in comune e pertanto si può ritenere che il recepimento della nuova norma europea sarà condivisibile sia dalle organizzazioni protezionistiche sia dal mondo della ricerca.

La nuova Direttiva sarà recepita in Italia con l'emanazione di un decreto legislativo che includerà misure più restrittive già presenti nell'attuale ordinamento nazionale, in conformità con l'articolo 2 della nuova Direttiva, intese ad assicurare una maggiore protezione degli animali. Già nel recepimento della Direttiva 86/609/CEE l'Italia aveva introdotto misure più rigorose in conformità all'articolo 24, quali ad esempio il divieto assoluto di utilizzazione di animali randagi, mentre per l'impiego di primati non umani, cani e gatti, di specie animali in via di estinzione, animali utilizzati a scopo didattico e per animali impiegati in procedure sperimentali effettuate senza anestesia è necessario il rilascio dell'autorizzazione ministeriale previa dimostrazione della mancanza di metodi alternativi e per verifiche medico-biologiche essenziali.

I principali aspetti innovativi introdotti dalla nuova Direttiva che modificheranno la regolamentazione dell'impiego degli animali ai fini sperimentali sono di seguito riportati.

Disposizioni generali

L'ambito di applicazione riguarderà, oltre ai vertebrati non umani vivi, anche le forme embrionali e fetali di mammiferi nell'ultimo terzo dello sviluppo, e i Cefalopodi vivi (Art. 1, c.3) ed è presumibile che tale estensione non comporterà particolari problemi di attuazione.

Negli scopi della nuova Direttiva rientrano la ricerca di base, la ricerca applicata, la ricerca traslazionale, le prove di qualità, efficacia, innocuità di farmaci e altri prodotti, gli studi per la protezione dell'ambiente naturale e per la conservazione delle specie. Inoltre sono compresi anche l'insegnamento superiore - alta formazione e le indagini medico-legali. L'inserimento delle indagini medico-legali potrebbe comportare un impatto molto marginale.

La soppressione degli animali a fine esperimento riveste una particolare importanza in termini di protezione degli animali e pertanto si dovrà assicurare che essi saranno soppressi provocando loro il minimo dolore, angoscia e sofferenza possibile. L'allegato IV riporta i metodi di soppressione umanitari idonei a seconda della specie animale, che dovranno essere impiegati da personale competente adeguatamente formato.

Disposizioni sull'uso di taluni animali nelle procedure

Gli articoli 7, 8, 9 e 11 introducono il divieto per l'impiego di specie animali in via di estinzione, primati non umani, specie animali allo stato selvatico e animali randagi, pur prevedendo deroghe per casi eccezionali e scientificamente documentati. In Italia l'impiego delle specie animali sopra riportate avviene soltanto dopo specifica autorizzazione ministeriale, ad eccezione dei randagi il cui impiego è vietato dalla Legge 14 agosto 1991, n. 281 (8).

I primati non umani usati nelle procedure dovranno provenire da soggetti allevati in cattività o da colonie autosufficienti. L'impatto sulla disponibilità di primati non umani per il nostro Paese dovrebbe essere trascurabile per quanto riguarda i primati non umani del Nuovo Mondo (Marmoset) (presenza di allevamenti autosufficienti) mentre è di difficile valutazione per le Scimmie del Vecchio Mondo.

L'articolo 8, comma 3 prevede il divieto assoluto di utilizzazione di scimmie antropomorfe (tranne che per motivi eccezionali e comunque autorizzato dalla Commissione UE) tuttavia l'impatto sarà nullo in quanto tali specie animali non sono più utilizzate da molti anni né in Italia né negli altri Paesi europei.

Gli Stati membri dovranno assicurare che, tranne quando non sia opportuno, le procedure sugli animali saranno effettuate sotto anestesia totale o locale, o che saranno impiegati analgesici o altri metodi appropriati per ridurre al minimo il dolore, la sofferenza e l'angoscia.

Procedure

Gli Stati membri dovranno assicurare che tutte le procedure saranno classificate come "non risveglio", "lievi", "moderate" o "gravi", secondo i criteri di assegnazione di cui all'allegato VIII. L'introduzione di criteri oggettivi per la classificazione di gravità avrà un impatto qualitativo positivo sulla formulazione qualità dei progetti di ricerca.

Riutilizzo

Gli Stati membri assicureranno che un animale, usato in una o più procedure, possa essere riutilizzato in nuove procedure solo se sono soddisfatte le seguenti condizioni: l'effettiva gravità delle procedure precedenti era "lieve" o "moderata"; è dimostrato che è stato pienamente ripristinato il benessere e lo stato di salute generale dell'animale; la procedura successiva è classificata come "lieve", "moderata" o "non risveglio" e previo parere del veterinario.

L'obiettivo di questa misura è di diminuire il numero degli animali impiegati nelle procedure ma è difficile prevedere l'entità di tale diminuzione. Il riutilizzo degli animali rappresenta una novità per il nostro Paese in quanto è applicata una norma abbastanza rigida che limita tale impiego e ribadita nella Circolare ministeriale del 14 maggio 2001, n. 6 (9).

Liberazione di animali e reinserimento

Gli Stati membri possono consentire che gli animali utilizzati o destinati a essere utilizzati nelle procedure siano reinseriti o reintrodotti, a determinate condizioni, in un habitat adeguato, in un sistema di allevamento o presso privati. In Italia tali iniziative, incoraggiate dal Ministero della Salute anche attraverso la Circolare ministeriale del 14 maggio 2001, n. 6, sono già operative da anni e molto dipenderà dalle capacità di accoglienza delle strutture riabilitative.

Autorizzazione

Le autorizzazioni rilasciate dall'Autorità competente per tutti gli stabilimenti allevatori, fornitori e utilizzatori e per tutti i progetti di ricerca rappresentano due aspetti che comporteranno, presumibilmente, un aumento del carico burocratico per le autorità competenti e per tutti gli operatori.

Gli stabilimenti allevatori, fornitori e utilizzatori di animali saranno autorizzati e registrati presso l'Autorità competente per un periodo limitato. Tutti gli stabilimenti dovranno dotarsi di un Organismo preposto al Benessere degli animali con precisi compiti e obblighi elencati all'articolo 27.

La normativa vigente nel nostro Paese non prevede l'obbligatorietà di tali organismi pertanto è presumibile che l'entità dell'impatto per gli stabilimenti dipenderà molto dall'attuale presenza o meno di tali organismi.

Per la verifica dei requisiti strutturali e gestionali (cfr. Art. 34) tutti gli stabilimenti allevatori, fornitori e utilizzatori saranno oggetto di ispezioni da parte delle autorità competenti con una frequenza stabilita in base ad un'analisi del rischio.

Ogni anno, comunque, le Autorità competenti sottoporranno ad ispezione almeno un terzo degli stabilimenti e con una percentuale appropriata di ispezioni non annunciate. Gli stabilimenti che ospitano primati non umani saranno ispezionati almeno una volta all'anno.

I requisiti minimi strutturali e gestionali riportati all'Allegato III sono stati aggiornati secondo le più recenti acquisizioni scientifiche nel campo della corretta stabulazione degli animali.

Tali requisiti minimi saranno obbligatori a partire dal 1 gennaio 2017 ed è ragionevole attendersi un duplice impatto che da una parte assicurerà migliori condizioni di stabulazione per gli animali e dall'altra porterà alla chiusura di stabilimenti di piccole dimensioni o alla rinuncia alla stabulazione per alcune specie animali poco utilizzate.

Tutti i progetti di ricerca dovranno essere autorizzati dall'Autorità competente soltanto dopo aver acquisito un parere positivo che valuti e verifichi il rispetto di alcuni criteri come la giustificazione dell'impiego degli animali e delle procedure ma soprattutto effettui un'accurata valutazione del danno/beneficio. Nell'autorizzazione sarà indicata la necessità o meno di effettuare una valutazione retrospettiva peraltro obbligatoria nel caso dell'impiego dei primati non umani. L'introduzione della valutazione retrospettiva oltre ad essere un'importante novità comporterà un discreto aumento del carico burocratico sia per le autorità competenti sia per gli operatori.

I progetti di ricerca dovranno essere presentati secondo un format che dovrà contenere tutti gli elementi previsti all'Allegato VI e in particolare l'esatta classificazione del livello di sofferenza previsto per le procedure sperimentali. Per aumentare la trasparenza dovrà essere allegata una sintesi non tecnica che sarà resa pubblica.

L'autorità competente dovrà rilasciare l'autorizzazione per tutti i progetti di ricerca entro 40 giorni lavorativi dalla presentazione della richiesta completa e idonea mentre possono essere necessari ulteriori 15 giorni per progetti "complessi" o multidisciplinari. L'autorizzazione potrà essere rilasciata per un periodo massimo di cinque anni.

Formazione del personale

Il personale dovrà essere in possesso di un'istruzione e una formazione adeguata prima di svolgere determinate funzioni quali la cura degli animali e la realizzazione di procedure compresa la soppressione con metodi umanitari. Le persone responsabili dei progetti di ricerca devono dimostrare di essere in possesso di una formazione scientifica attinente al lavoro da eseguire e di conoscenze specifiche sulla specie interessata.

Le autorità competenti pubblicheranno, in base agli elementi di cui all'allegato V, i requisiti minimi in materia di istruzione e formazione e i requisiti per ottenere, mantenere e dimostrare le competenze richieste.

Tutti gli aspetti riguardanti la formazione del personale avranno un impatto importante sia per la protezione degli animali e sia per gli operatori.

Approcci alternativi

Gli Stati membri sono chiamati a dare un importante e notevole contributo per lo sviluppo di nuovi approcci alternativi in applicazione del principio delle 3R.

Ogni Stato Membro dovrà individuare laboratori idonei per la realizzazione dei metodi alternativi e un punto di contatto nazionale (per l'Italia è stato individuato il Laboratorio di Substrati cellulari presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia - Emilia Romagna).

È prevedibile un importante impegno non solo per la messa a punto di metodiche alternative ma soprattutto per la loro diffusione.

Attuazione

Gli Stati membri adottano e pubblicano entro il 10 novembre 2012 le disposizioni legislative, regolamentari e amministrative necessarie per conformarsi alla nuova Direttiva.

Gli Stati membri applicano tali disposizioni a partire dal 1° gennaio 2013.

Bibliografia

1. Comunità Europea. Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L1276 del 20 ottobre 2010.
2. Unione Europea. Trattato di Lisbona sul Funzionamento dell'Unione Europea (TFUE) del 05 maggio 2008. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* n. C115, 9 maggio 2008.
3. Unione Europea. Direttiva 86/609/CEE del 24 novembre 1986 - concernente il riavvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri alla protezione degli animali utilizzati ai fini sperimentali o ad altri fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea* n. L358, 18 dicembre 1986.
4. Italia. Decreto Legislativo 15 febbraio 2005, n. 50. Attuazione delle Direttive 2003/15/CE e 2003/80/CE in materia di prodotti cosmetici. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 87 del 15 aprile 2005.
5. Comunità Europea. Regolamento CE n. 1907/2007 del 18/12/2007 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH). *Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea* n. L136, 29 maggio 2007.
6. Consiglio d'Europa. Convenzione per la protezione degli animali vertebrati utilizzati ai fini sperimentali o ad altri fini scientifici, ETS 123, 18 marzo 1986.
7. Unione Europea. Proposta di Direttiva del Parlamento europeo e del Consiglio sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. Bruxelles 5 novembre 2008. COM(2008) 543 definitivo.
8. Italia. Legge quadro in materia di affezione e prevenzione del randagismo del 14 agosto 1991. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 203, 30 agosto 1991.
9. Italia. Circolare del 14 maggio 2001, n. 6. Applicazione del decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 116 in materia di protezione degli animali utilizzati ai fini sperimentali o ad altri fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 144, 23 giugno 2001.

USO DEI PRIMATI NELLA RICERCA SCIENTIFICA ALLA LUCE DELLA NUOVA DIRETTIVA

Gemma Perretta
Istituto di Biologia Cellulare e Neurobiologia, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma

La questione dei primati nel processo di revisione della Direttiva europea

Uno degli elementi chiave che sin dall'inizio hanno stimolato maggiore discussione e suscitato più accese controversie nel processo di revisione della Direttiva europea 86/609 CEE è stato quello relativo alla questione "primati non umani". La prossimità genetica con l'uomo e le caratteristiche neurofisiologiche e comportamentali altamente complesse e sviluppate in questi animali conferiscono al loro utilizzo nelle procedure scientifiche implicazioni etiche specifiche ed, inoltre, comportano problemi pratici in termini di soddisfacimento delle loro necessità sociali e ambientali nelle condizioni restrittive di laboratorio.

Uno dei punti cardine su cui si è sviluppato il dibattito è rappresentato dalla dichiarazione del 2002 dello *Scientific Steering Committee* della Commissione europea (1) nella quale si evidenziava la perdurante necessità, almeno per il prossimo futuro, dell'utilizzo dei primati non umani nella ricerca biomedica.

Nel settembre del 2007, il Parlamento europeo adottava una dichiarazione (2), sottoscritta dalla maggioranza dei suoi membri, in cui si sollecitava la Commissione europea a predisporre tutte le misure necessarie per mettere fine all'uso negli esperimenti scientifici sia delle scimmie antropomorfe sia delle scimmie prelevate dall'ambiente naturale ed, inoltre, di stabilire un programma per la sostituzione di tutti i primati utilizzati nella sperimentazione biomedica con metodiche alternative. Sebbene l'adozione di questa dichiarazione connotava chiaramente quello dei primate non umani come uno degli argomenti di maggior contrasto all'interno del processo di revisione della Direttiva, essa sortiva anche l'effetto di stimolare numerose organizzazioni in rappresentanza della comunità scientifica e dell'industria ad iniziare un'intensa attività di pressione sui membri del Parlamento per sensibilizzarli sull'importanza della ricerca con gli animali, sul ruolo dei primati non umani e sugli elevati standard di benessere adottati in Europa per il mantenimento e la cura di questi animali.

Nel 2008, la Direzione Generale Ambiente della Commissione europea assegnava il compito di formulare un'opinione scientifica bilanciata e indipendente sulla possibilità di sostituire l'uso dei primati non umani ad un comitato scientifico (3) composto da esperti del settore. Tra i vari aspetti che il comitato era chiamato ad analizzare vi era in particolare quello relativo all'impatto che avrebbe esercitato un divieto all'uso dei primati non umani sulla ricerca biomedica (es. sullo studio delle malattie neurodegenerative, infettive, immuno-mediate, ecc.). Dopo un'analisi approfondita delle evidenze scientifiche allora disponibili in letteratura, il comitato si espresse dichiarando che non esistevano valide alternative che permettessero la cessazione dell'uso dei primati nella ricerca di base e applicata o nello sviluppo e test di nuovi farmaci. Il rapporto puntualizzava che tale posizione avrebbe dovuto essere rivalutata con regolarità alla luce delle metodiche alternative che nel frattempo sarebbero state sviluppate e validate.

Sulla base delle conclusioni del rapporto la Commissione, nella sua risposta al Parlamento europeo, affermava che, allo stato delle conoscenze, non era possibile eliminare l'uso dei primati nella ricerca biomedica.

Nel corso degli ultimi anni il dibattito ha trovato inoltre eco e amplificazione in numerosi articoli e commenti pubblicati su riviste scientifiche tra cui la prestigiosa *Nature* (4, 5, 6) in cui erano espresse le preoccupazioni di scienziati e ricercatori per il fatto che la nuova Direttiva potesse contenere misure restrittive tali da determinare una forte limitazione per la ricerca europea all'utilizzo dei primati non umani. D'altra parte, numerose organizzazioni e associazioni per i diritti degli animali hanno esercitato forti pressioni politiche per ridurre drasticamente o addirittura mettere al bando la sperimentazione sui primati.

La Direttiva 2010/63 (7) è perciò il risultato di un lungo e complesso dibattito fra posizioni diverse e riflette il compromesso politico probabilmente più accettabile per le diverse parti coinvolte. Per i ricercatori non si configurano rilevanti modifiche nella possibilità di effettuare ricerca sui primati, e i gruppi animalisti, a loro volta, non possono che accogliere con favore il fatto che, per la maggior parte degli stati membri dell'Unione europea, la nuova Direttiva rappresenti un significativo miglioramento in termini di protezione degli animali rispetto alla legislazione precedente.

Uso dei primati nelle procedure sperimentali in Europa

I dati statistici relativi ai diversi stati membri dell'Unione europea (Tabella 1), raccolti e pubblicati ogni tre anni dalla Commissione, dimostrano che in Europa, negli ultimi anni, il numero di animali utilizzati per procedure scientifiche si aggira intorno ai 12 milioni l'anno; di questi, i primati rappresentano circa lo 0,09%, ovvero approssimativamente 10.000 soggetti fra le varie specie [§].

Tabella 1. Animali utilizzati dagli stati membri dell'Unione Europea dal 1996 al 2008 (2°, 3°, 4°, 5°, 6° Rapporto sulle statistiche degli stati membri dell'Unione Europea)

	Anno					
	1996	**1997**	**1999**	**2002*** **	**2005**** **	**2008**
N° stati membri	14	1 (Francia)	15	15	25	27
N° totale animali	9.036.808	2.609.322	9.814.171	10.731.020	12.117.581	12.001.022
N° totale primati	8.059*	2.622	9.097	10.362	10.449	9.569
Proscimmie	/	82	726	1.095	677	1.261
Scimmie Nuovo Mondo	/	88	1.353	1.192	1.564	904
Scimmie Vecchio Mondo	/	2.452	5.199	8.075	8.208	7.404
Antropomorfe	79	0	6	0	0	0
	/	/	1.813**	/	/	/
% primati sul totale	**0,09**	**0,1**	**0,09**	**0,1**	**0,09**	**0,08**

* Nel 1996 la classificazione e il raggruppamento utilizzati da alcuni stati membri per le diverse specie di scimmie non ha permesso una chiara distinzione nei quattro gruppi previsti.
** Nel 1999 la Germania ha fornito i dati sui primati senza distinzione nei quattro gruppi previsti.
*** I dati includono quelli presentati dalla Francia relativi all'anno 2001.
**** I dati includono quelli presentati dalla Francia relativi all'anno 2004.

[§] Le tabelle statistiche dalla Commissione europea prevedono il raggruppamento dei primati in: proscimmie, scimmie del Nuovo Mondo, scimmie del Vecchio Mondo e scimmie antropomorfe.

Attualmente, i primati non umani sono utilizzati esclusivamente in procedure nelle quali non esistono alternative e nessun'altra specie sia ritenuta idonea agli scopi della ricerca. D'altra parte, la legislazione europea che regolamenta l'autorizzazione alla commercializzazione dei farmaci prevede l'impiego di una specie che non sia inclusa fra i roditori per i test di sicurezza ed efficacia; inoltre, molecole prodotte con l'utilizzo delle moderne biotecnologie esercitano proprietà altamente umano-specifiche così da rendere necessario studiarne la sicurezza in specie il più possibile simili all'uomo. Per tali motivi, la maggioranza dei primati sono utilizzati in procedure per prove di sicurezza ed efficacia di prodotti farmaceutici e dispositivi. La parte rimanente viene utilizzata per studi biologici di base e per la ricerca e sviluppo di prodotti e dispositivi per la medicina umana, odontoiatria e medicina veterinaria.

In accordo con la comunità scientifica (8) e la ricerca biomedica più avanzata, i primati sono essenziali e insostituibili per lo studio di malattie immuno-mediate (es. la sclerosi multipla), neurodegenerative (Parkinson, Alzheimer, ecc.), malattie infettive (HIV, Malaria, TB, Epatite, SARS, ecc.) e altre importanti affezioni morbose.

Tuttavia, a queste posizioni sostenute fondamentalmente dai ricercatori si oppongo altre opinioni che dissentono per una serie di motivi di carattere etico, scientifico e per un approccio a sostegno delle metodiche alternative (9).

I primati e la Direttiva 2010/63/EC

Gli articoli

A conferma dell'enfasi riservata dalla nuova Direttiva alla questione dei primati non umani è il numero di riferimenti a queste specie animali in essa contenuti, ovvero 39 volte (oltre alle scimmie antropomorfe, citate 4 volte), addirittura superiore al numero di citazioni del termine dolore che compare "solo" 33 volte. Inoltre, queste specie sono considerate in ben 11 articoli (8, 10, 28, 31, 32, 34, 39, 42, 54, 55, 58) e nell'allegato II.

Nella parte iniziale, introduttiva all'articolato, si esordisce affermando che "l'uso di primati non umani dovrebbe essere autorizzato unicamente in settori biomedici fondamentali per gli esseri umani per i quali non sono ancora disponibili altri metodi alternativi di sostituzione".

Nel Capo II (Disposizioni sull'uso di taluni animali nelle procedure), l'articolo 8 è esclusivamente dedicato ai primati e stabilisce che essi possano essere utilizzati quando sia scientificamente provato che altre specie animali non permettano di raggiungere lo scopo della procedura. Quest'ultima, inoltre, deve avere come fine la ricerca di base, la conservazione delle specie, la ricerca applicata o traslazionale che persegua la profilassi, la prevenzione, la diagnosi o la cura delle malattie degli esseri umani, o che sia realizzata per lo sviluppo, produzione o per le prove di qualità, di efficacia e di innocuità dei farmaci, ecc. Tuttavia, l'uso dei primati nella ricerca transazionale e applicata è limitato a procedure che siano svolte in relazione ad affezioni umane debilitanti e potenzialmente letali. La Direttiva esplicita che per "affezione debilitante" si debba intendere la riduzione delle normali funzioni fisiche o psichiche di una persona. L'articolo 8 si conclude con il comma 3 in cui viene stabilito che le scimmie antropomorfe (scimpanzé, bonobi, gorilla, oranghi) non sono utilizzate nelle procedure, fatta salva la clausola di salvaguardia (articolo 55), ovvero lo Stato Membro può adottare misure provvisorie che ne autorizzino l'uso previa trasmissione alla Commissione delle informazioni necessarie affinché essa possa prendere una decisione in merito entro 30 giorni dalla comunicazione. Sebbene nel testo finale le restrizioni all'uso dei primati non umani siano ridimensionate rispetto a precedenti versioni della Direttiva (es. la ricerca di base è stata aggiunta tra le finalità consentite), rimangono tuttavia dubbi sulla limitazione delle procedure ad affezioni umane

potenzialmente letali o debilitanti. Infatti, non è chiaro come l'applicazione di tale restrizione potrà essere realizzata nella pratica e come sarà recepita dagli stati membri nelle legislazioni nazionali; in ogni caso, non è auspicabile la redazione di elenchi di procedure "accettabili" in quanto non è sempre possibile prevedere quali saranno gli sviluppi scientifici in campo medico nel prossimo futuro.

L'articolo 10 riguarda l'utilizzo degli animali prelevati allo stato selvatico ed, in particolare per i primati non umani, stabilisce che, a partire dalle date definite nell'allegato II, essi possano essere utilizzati nelle procedure solo se discendenti da animali riprodotti in cattività o provenienti da colonie autosufficienti; a tale riguardo, l'articolo specifica che per colonia autosufficiente si debba intendere quella in cui gli animali non sono stati prelevati allo stato selvatico e mostrano abituazione nei confronti dell'uomo. Il presupposto per la formulazione di questo articolo è da ricondurre al fatto che la cattura di primati non umani dall'ambiente naturale è un evento stressante per gli animali e comporta un rischio elevato di lesioni e sofferenze durante la cattura e il trasporto. La questione della possibilità di utilizzare esclusivamente primati discendenti da animali riprodotti in cattività, ovvero di generazione F2 e successive generazioni, ha suscitato la preoccupazione di varie organizzazioni e associazioni le quali sostengono che, allo stato attuale, il numero di soggetti con le caratteristiche indicate nell'articolo sia insufficiente rispetto alle richieste per la ricerca e che i centri di allevamento e riproduzione necessitano di tempi lunghi per poter fornire il numero necessario di animali F2. Per questo motivo, la Commissione ha stabilito di effettuare uno studio, in consultazione con gli stati membri e le parti interessate, per esaminare la fattibilità del requisito di passare all'impiego di soli primati discendenti da animali riprodotti in cattività; tale studio sarà pubblicato entro il 2017 e potrebbe essere corredato, se del caso, di proposte di modifica dell'allegato II. Inoltre, la Commissione si propone di realizzare un'altra indagine allo scopo questa volta di valutare la fattibilità della richiesta di utilizzo di soli primati non umani provenienti da colonie autosufficienti; tale studio sarà pubblicato entro il 10 novembre 2022. Per facilitare la Commissione nella preparazione di entrambi gli studi, la *European Federation of the Pharmaceutical Industries and Associations* (EFPIA) e la *Federation of European Laboratory Animal Associations* (FELASA) hanno incaricato un gruppo di lavoro di esperti di produrre un documento contenente i criteri proposti per la realizzazione degli studi di fattibilità.

Passando al Capo IV (Autorizzazione), Sezione 1, nell'articolo 28 si afferma la necessità che gli stati membri assicurino che gli allevatori attuino strategie per aumentare la percentuale di primati non umani discendenti da animali nati in cattività.

L'articolo 31 della Direttiva detta disposizioni circa la raccolta di informazioni sui primati non umani, come per i cani e i gatti; per ogni animale si dovrà istituire un fascicolo personale contenente i dati salienti a partire dalla nascita. Ciò affinché si possano mettere in atto tutte le misure a garanzia del benessere animale in relazione alle esigenze e caratteristiche individuali. Inoltre, ogni primate è contrassegnato, entro lo svezzamento, con un marchio permanente di identificazione individuale nel modo meno doloroso possibile (articolo32).

Nella sezione 2, l'articolo 34 stabilisce che gli allevatori, i fornitori e gli utilizzatori di primati non umani siano sottoposti a ispezione da parte dell'autorità competente almeno una volta l'anno.

La valutazione retrospettiva (articolo 39), la cui opportunità per le altre specie animali sarà decisa di volta in volta tenendo conto degli elementi caratterizzanti il progetto, dovrà invece essere effettuata in ogni caso quando si preveda l'impiego di primati nelle procedure. Dalle risultanze di tale valutazione sarà possibile individuare e correggere eventuali carenze dovute, per esempio, ad una sottovalutazione dei livelli di dolore cui gli animali sono sottoposti, e predisporre tutte le misure necessarie a maggior salvaguardia del loro benessere.

Anche per quanto riguarda la procedura autorizzativa dei progetti (articolo 42), i primati sono tenuti in particolare considerazione nella Direttiva, infatti i progetti che utilizzano questi animali non possono essere autorizzati secondo una procedura amministrativa semplificata come invece è previsto per le altre specie nel caso di progetti con procedure con livello di gravità fino a "moderato", che sono necessari per soddisfare requisiti regolatori o a fini diagnostici e di produzione con metodi prestabiliti.

Nel Capo VI (Disposizioni finali), l'articolo 54, relativo alle informazioni statistiche che gli i stati membri raccolgono e pubblicano con cadenza annuale, stabilisce che nelle tabelle dovranno essere indicati l'origine e le specie di primati non umani utilizzati nelle procedure. Ciò permetterà, tra l'altro, di conoscere l'andamento dei flussi di importazione dei primati dai Paesi d'origine o da Paesi al di fuori dell'Unione Europea, nonché la consistenza numerica degli animali riprodotti in Europa.

Infine, nell'articolo 58 è ulteriormente ribadita l'importanza di riservare un'attenzione specifica ai primati non umani quando, entro il 10 novembre 2017, la Commissione riesaminerà la Direttiva; in tale circostanza dovrà tener conto dei progressi nello sviluppo di metodi alternativi che non prevedono l'uso di animali, in particolare di primati non umani, e proporre modifiche normative qualora siano ritenute necessarie. La Commissione provvederà inoltre a periodici riesami tematici sull'implementazione delle 3R, con particolare riferimento ai primati non umani, per consentire un adeguamento agli sviluppi tecnologici e alle nuove conoscenze scientifiche e, più in generale, per promuovere ulteriori misure per il benessere degli animali.

Oltre agli specifici richiami ai primati non umani presenti negli articoli della Direttiva, l'allegato III stabilisce i requisiti per la loro cura e sistemazione, suddividendoli in quattro gruppi: uistitì e tamarini, scimmie scoiattolo, macachi e cercopitechi, e babbuini e indicando per ciascuno le dimensioni minime dell'alloggiamento; queste dovranno essere rispettate dal 1° gennaio 2017. Ad un confronto con le linee guida della precedente Direttiva si osserva un notevole miglioramento quantitativo e qualitativo delle condizioni di stabulazione che dovranno essere tali da permettere ai primati di manifestare il più ampio repertorio comportamentale possibile e offrire un ambiente sufficientemente complesso cosicché l'animale possa correre, camminare, arrampicarsi e saltare.

Che cosa cambia nel nostro Paese?

Entro il 1° gennaio 2013 gli stati membri dell'Unione Europea dovranno tradurre la Direttiva nella legislazione nazionale e predisporre le misure amministrative necessarie per una adeguata gestione del dettato legislativo.

La situazione in Italia, per quanto riguarda i primati, non dovrebbe modificarsi in modo sostanziale in quanto l'attuale DL.vo 116/1992 già contiene alcuni degli elementi che sono presenti nella nuova Direttiva; per esempio, nella nostra legislazione è stabilito che ogni progetto che contenga procedure da effettuarsi su primati non umani debba essere preventivamente autorizzato dal Ministero della Salute; poiché la Direttiva prevede che l'autorità competente sia tenuta a trasmettere la propria decisione entro 40 giorni dalla richiesta, si potrebbe assistere ad un miglioramento della tempistica di rilascio delle autorizzazioni rispetto alla situazione attuale.

Il divieto all'utilizzo di scimmie antropomorfe non avrà alcun riflesso sulle realtà italiana in quanto nel nostro Paese non esistono strutture per l'allevamento e l'utilizzo sperimentale di queste specie.

Per quanto riguarda l'altro divieto, contenuto nella Direttiva, di utilizzare animali prelevati allo stato selvatico anch'esso è ininfluente nel contesto italiano in quanto i primati non umani

sono inclusi nell'allegato I del DL.vo 116/1992 che elenca le specie che devono essere di allevamento per poter essere utilizzate in esperimenti.

Quindi, gli elementi innovativi della Direttiva 2010/63/EC specifici per i primati sono rappresentati dalla necessità di una raccolta di informazioni più dettagliate rispetto all'attuale normativa. Ma, più sostanzialmente, ciò che maggiormente potrebbe riflettersi sull'attuazione di procedure sui primati è il fatto che queste dovranno essere limitate alla ricerca transazionale e applicata ed essere svolte in relazione ad affezioni umane debilitanti e potenzialmente letali. Come accennato in precedenza, sarà interessante verificare come l'applicazione di tale restrizione sarà recepita nella legislazione italiana e realizzata nella pratica; è auspicabile che, come principio generale, si adottino criteri di flessibilità, modulabili di volta in volta a seconda dei casi e che valutino, inoltre, le misure messe in atto per ridurre al minimo la sofferenza degli animali. Notevole importanza potrebbe quindi assumere l'analisi del possibile danno arrecato agli animali in relazione ai benefici attesi dal progetto.

La valutazione retrospettiva, necessaria nel caso di progetti che prevedono l'uso di primati, è l'altro elemento innovativo che dovrà essere incluso nella legislazione nazionale. Sebbene questo requisito probabilmente determinerà un aggravio burocratico e amministrativo, tuttavia non potrà che tradursi in una maggiore completezza e trasparenza delle informazioni, incoraggiando il ricercatore ad una più attenta osservazione degli effetti delle procedure sul benessere degli animali utilizzati e, in ultima analisi, richiamandolo ad una corretta applicazione del principio delle 3R.

Conclusioni

Sebbene non si siano ancora spenti gli echi delle critiche di coloro che ritengono la Direttiva eccessivamente carica di divieti e restrizioni ingiustificati, responsabile di una distinzione artificiosa fra ricerca di base e applicata, né di coloro che, al contrario, ritengono che ai diversi divieti posti dal legislatore si oppongano altrettante immotivate deroghe, la Direttiva europea, a mio parere, rappresenta un progresso nella protezione degli animali utilizzati a fini scientifici ed, in particolare dei primati non umani. Ritengo inoltre che una valutazione completa e circostanziata potrà essere formulata soltanto dopo che le norme in essa contenute saranno trasposte nella nostra legislazione. È importante che in questo processo siano salvaguardati criteri di flessibilità ed equilibrio al fine di evitare rigide schematizzazioni e barriere che renderebbero difficile effettuare ricerche sui primati senza, d'altra parte, tradursi in un effettivo miglioramento delle loro condizioni di benessere.

I primati non umani sono a tutt'oggi una risorsa di enorme valore in numerosi campi della ricerca biomedica in cui non è possibile avvalersi di metodi sostitutivi. I ricercatori e tutti coloro che sono coinvolti nel loro mantenimento e utilizzo nelle procedure dovrebbero integrare il rispetto delle norme giuridiche alla consapevolezza dell'importanza di un comportamento etico nei confronti degli animali di cui sono responsabili.

Bibliografia

1. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-general. *The need for non-human primates in biomedical research. Statement of the Scientific Steering Committee adopted at its Meeting of 4-5 april 2002*. Disponibile all'indirizzo: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out253_en.pdf ; ultima consultazione 17/02/2012.

2. European Parliament. *Written declaration on primates in scientific experiments 2004/2009. pursuant to Rule 116 of the Rules of Procedure by Jens Holm, Rebecca Harms, John Bowis, Martine Roure and Mojca Drčar Murko on primates in scientific experiments*. September 6, 2007. Disponibile all'indirizzo: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/declaration_nhp_en.pdf; ultima consultazione: 21/02/2012.

3. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-general, Scientific Committee on Health and Environmental Risks – SCHER. *The need for non-human primates in biomedical research, production and testing of products and devices*; 2009. Disponibile all'indirizzo: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/scher_o_110.pdf; ultima consultazione: 21/02/2012.

4. Call to action: European scientists who support neuroscience research on primates should tell their politicians why [editorial]. *Nature* 2008;456:281-82.

5. Replacement of animals in research will never be possible [correspondence]. *Nature* 2009;457:147.

6. Lab-animal battle reaches truce [news]. *Nature* 2010;464:964.

7. EEC. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Communities L276*, 33-79, 20 ottobre 2010. Disponibile all'indirizzo: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF; ultima consultazione: 21/02/2012.

8. A working group report chaired by Sir David Weatherall. *The use of non-human primates in research*; FRS FMedSci 2006. Disponibile all'indirizzo: http://www.bprc.nl/BPRCE/L4/newsdownloads/The%20use%20of%20non-human%20primates%20in%20research%20-%20The%20Weatherall%20Report.pdf; ultima consultazione: 21/02/2012.

9. Dr Hadwen Trust For Humane Research. *Animals in laboratories: Let down by Labour*. 2008. Disponibile all'indirizzo: http://www.politics.co.uk/microsites2/447630/graphics/LetDownBy Labour.pdf; ultima consultazione: 21/02/2012.

EVOLUZIONE DEI COMITATI ETICI

Emanuela D'Amore e Paolo Coluccio
Settore Sperimentazione Animale (SBGSA), Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il termine Bioetica (dal greco antico έθος, "ethos" carattere o comportamento e βίος "bios", vita) disciplina che si occupa della valutazione morale applicata alla ricerca biomedica, compare per la prima volta, con il significato attuale, nel 1970 quando l'oncologo americano Van Rensselaer Potter compone il saggio *Bioethics: Bridge to the Future* cioè "Bioetica: un ponte verso il futuro"(1). Potter scriveva: *Ho scelto la radice "bio" per rappresentare la conoscenza biologica, la scienza dei sistemi viventi; e "ethics" per rappresentare la conoscenza del sistema dei valori umani.* Lo scopo di questa disciplina doveva essere di fare come da "ponte" tra le conoscenze scientifiche e quelle umanistiche, cercando quindi di tutelare la vita umana e non solo. Quindi il concetto di bioetica doveva abbracciare un campo molto più ampio, comprensivo pure del mondo in cui l'uomo vive, della natura, dell'atmosfera, ecc.

In realtà le problematiche etiche relative alle sperimentazioni scientifiche erano state sollevate già alla fine degli anni Quaranta, in particolare con il Processo di Norimberga nel quale si condannarono i medici nazisti che nei campi di concentramento tedeschi avevano praticato senza scrupolo esperimenti su esseri umani ed eutanasie forzate su persone ritenute "indegne di vivere" (ritardati mentali e menomati fisici).

Relativamente alla sperimentazione animale, è intorno alla fine degli anni '60 del secolo scorso, in un nuovo scenario politico e sociale caratterizzato dalla nascita di numerosi movimenti di liberazione che lottavano contro ogni forma di schiavitù e di discriminazione, che cominciarono a svilupparsi le prime critiche nell'ambito della cultura angloamericana soprattutto in seguito alle pubblicazioni di testi di alcuni filosofi come l'australiano Peter Singer con il testo *Animal Liberation* (2) che è considerato il manifesto ideologico dei movimenti animalisti.

Le teorie di autori come Peter Singer e Tom Regan producono nel tempo un cambiamento culturale che modifica in parte il rapporto uomo-animale, conferendo agli animali la dignità di esseri senzienti. Si modifica l'atteggiamento dell'uomo nei confronti degli animali e quindi anche nell'ambito della ricerca biomedica alcuni scienziati iniziano ad interrogarsi se l'acquisizione di conoscenza valga qualche sofferenza inflitta agli animali. L'affermazione del principio della libertà della ricerca deve coesistere con quello di una "scienza con coscienza", non potendo eludere gli interrogativi etici che la ricerca pone.

In considerazione del fatto che l'uomo, creatura intelligente e consapevole, è comunque sensibile alla sofferenza animale, è lecito che ci si ponga dubbi morali sulla sperimentazione ed è comprensibile, che ci si adoperi per diminuire, per quanto possibile, il carico di "sofferenza" che le sperimentazioni possono determinare sugli animali. La nascita di un vivace dibattito culturale e il riconoscimento di un problema etico hanno contribuito, e non poco, a diffondere e ad aumentare la sensibilità dell'opinione pubblica, dei ricercatori e del mondo scientifico verso i diritti degli animali.

Tale cambiamento è stato quindi recepito anche a livello legislativo, determinando nel 1986 l'emanazione della Direttiva CEE n. 609/86 e il successivo recepimento italiano, il Decreto Legislativo n. 116 del 31 gennaio 1992 (3, 4).

Con tali norme legislative si è cercato per la prima volta di sancire delle regole che potessero essere applicate all'utilizzo degli animali nella ricerca biomedica e si è introdotto il concetto di benessere animale. Inoltre, il DL.vo 116/1992 introduce il concetto dell'autodichiarazione da

parte del responsabile del protocollo sperimentale. In pratica il responsabile della ricerca deve descrivere, utilizzando l'apposita modulistica, le procedure che attuerà e soprattutto deve dichiarare il grado di sofferenza che verrà esercitato sugli animali. In questo modo il ricercatore, deve tenere in considerazione il fatto che, la sua ricerca potrà determinare sull'animale stress e/o dolore e quindi dovrà necessariamente operare delle scelte nelle procedure e nelle metodiche, cercando di ridurre tali sofferenze (es. con l'utilizzo dell'anestesia e/o degli analgesici) o di ridurre il numero di animali utilizzati.

Il Decreto prevede che, nel caso in cui la ricerca rientri nei casi previsti dagli art. 8 e 9 in cui è necessario il rilascio dell'autorizzazione da parte del Ministero della Salute, la valutazione etica del progetto sia demandata a livello centrale (Ministero della Salute e Istituto Superiore di Sanità). In tal caso oltre alle procedure applicate sugli animali, l'esperto che valuta il progetto dovrà prendere in considerazione una serie di elementi tra cui l'obiettivo che la ricerca si pone il razionale, la strategia sperimentale che si vuole applicare, la specie e il numero degli animali, le condizioni di stabulazione e il curriculum vitae del responsabile da cui deve chiaramente emergere una preparazione specifica nel settore.

Successivamente all'entrata in vigore della Direttiva n. 609/86/CEE e in Italia, del DL.vo n. 116/1992, presso le sedi universitarie e gli enti di ricerca pubblici e/o privati, sono sorti degli Organismi collegiali, su base essenzialmente volontaria, con lo scopo di effettuare una valutazione etica dei progetti di ricerca basata essenzialmente sull'applicazione dei principi delle 3R di Russell e Burch. Inizialmente tali Comitati sono stati visti dal mondo accademico e della ricerca scientifica in modo piuttosto scettico. Oggi, invece, la maggior parte dei ricercatori sembra aver accettato la presenza di un Organismo superiore che svolga un'attività di valutazione, anche se il mancato riconoscimento legislativo e la non obbligatorietà del parere espresso ne riducono l'autorevolezza.

Nei Paesi europei, tali organismi (*Animal Welfare Committeees*, AWCs) operano a livello locale, regionale o nazionale. Per esempio in Belgio sono stati istituiti da un Regio Decreto 25 Comitati Locali e un Comitato Nazionale, *National Deontological Committe*; in Inghilterra ci sono 266 Comitati etici, di cui 265 Locali e uno Nazionale, *Animal Procedure Committe*; in Germania sono presenti 35 Comitati etici regionali; in Francia sono stati istituiti dei Comitati etici presso le istituzioni. Esiste quindi una notevole difformità tra i diversi Paesi europei che interessa anche la composizione, le funzioni e le modalità di valutazione delle sperimentazioni. Per esempio i pareri elaborati dalle AWCs possono essere a carattere consultivo o obbligatorio secondo quanto stabilito dalle specifiche norme nazionali.

Anche nel nostro Paese, verso fine degli anni '90, sono sorti commissioni, comitati, centri di bioetica e in molti centri di ricerca, sia pubblici che privati, sono operativi i comitati istituzionali di controllo della sperimentazione animale. Tali strutture possono svolgere una duplice funzione: da un lato,di controllo e di verifica che gli esperimenti attuati sugli animali siano scientificamente validi, metodologicamente appropriati e statisticamente congrui e che l'utilizzo degli animali sia insostituibile (in ottemperanza all'art.4 e 5 del DL.vo n.116/1992) e dall'altro, una funzione prevalentemente tecnico-scientifica, attuata sostanzialmente dal responsabile dello stabulario e dal medico veterinario che agiscono a fianco dei ricercatori sia durante la fase di elaborazione e di stesura del protocollo sperimentale che durante l'attuazione pratica dello stesso.

Nel giugno 2002, quando la diffusione dei Comitati etici di Ateneo era ancora limitata, l'Università di Pisa promosse, attraverso la diffusione di un questionario e la programmazione di una serie di incontri, la creazione di un Coordinamento dei Comitati Etici di Ateneo e conseguentemente la creazione di una linea comune. Dall'analisi dei questionari (13 quelli compilati) emerse una evidente disomogeneità delle varie strutture e nella riunione conclusiva fu stilato un documento che prevedeva la creazione di "un modello di Comitato", concepito

sulla base delle esperienze acquisite fino ad allora, volto ad uniformare, quanto più possibile, la struttura e l'attività di tali organismi.

Recentemente il Settore Sperimentazione Animale dell'Istituto Superiore di Sanità, con finalità esclusivamente conoscitive, ha diffuso un questionario che è stato inviato alle Università e ai principali enti di ricerca allo scopo di conoscere la presenza, la composizione e le principali funzioni dei Comitati Etici. Sono stati inviati circa 90 questionari e a tutt'oggi, sono pervenute 25 risposte, 16 provenienti da atenei universitari e 9 da enti di ricerca, che seppur non rappresentative numericamente, possono darci un'idea della situazione italiana. Dalle risposte si può desumere che:

- il 20 % delle strutture di ricerca non hanno ancora alcun organismo che fornisca né consulenza tecnico scientifica né consulenza etica;
- il 12% delle strutture sono fornite di due diversi Organismi: un Comitato o Organismo che svolge attività prevalentemente tecnico-scientifica e un Comitato Etico che rappresenta il punto di riferimento per tutte le questioni etiche che riguardano gli animali;
- il 16% hanno istituito Organismi di supporto prevalentemente tecnico che offrono ai ricercatori consulenza e collaborazione pratica nello svolgimento delle ricerche.
- il 24% hanno Comitati con funzione esclusivamente etica di valutazione dei progetti di ricerca e il 28%, infine, ha istituito delle Comitati che svolgono entrambe le funzioni

Anche la composizione di tali organismi è estremamente eterogenea e variamente rappresentata: sono composti da un numero variabile di membri da 5 a 12, prevalentemente interni alla struttura, laureati in medicina (con o senza coinvolgimento con la sperimentazione animale), in medicina veterinaria, in scienze biologiche, oltre a tecnici, consulenti legali ed esperti di bioetica.

Le principali funzioni dei membri di tali Comitati sono:

- verificare che il benessere degli animali sia tutelato al massimo, contenendo al minimo le sofferenze;
- controllare che il numero di animali stimato per una ricerca corrisponda al minimo indispensabile per ottenere risposte valide;
- valutare in modo critico i progetti di ricerca nonché verificare il reale valore scientifico dello studio proposto;
- verificare che il risultato ricercato non possa essere ottenuto attraverso l'utilizzo di un altro metodo scientificamente valido che non preveda l'impiego di animali;
- aggiornare i ricercatori sulle disposizioni regolatrici e monitorarne l'osservanza;
- valutare l'adeguatezza dei protocolli anestesiologici e delle terapie analgesiche;
- valutare l'adeguatezza dei metodi di soppressione adottati;
- valutare l'adeguatezza della preparazione professionale del personale impiegato nello studio, in relazione alle mansioni;
- supervisionare le procedure sperimentali.

Tali Comitati generalmente hanno un loro specifico regolamento: è previsto che possano avvalersi di membri esterni qualificati, nominati ad hoc, esperti in materie o argomenti che siano oggetto di particolari questioni sottoposte al loro parere. È previsto che all'attività del Comitato partecipi uno o più rappresentanti dei medici veterinari addetti alla sorveglianza degli animali stabulati che riferiscono al Comitato gli esiti della loro attività di controllo.

Nell'ambito di tali regolamenti un argomento importante, che solo in pochi casi è stato preso in considerazione, è rappresentato dal conflitto di interesse che invece risulta ampiamente disciplinato in ambito europeo. Soprattutto in strutture di dimensioni ridotte, può capitare che un docente ricopra più cariche nell'ambito della stessa istituzione e che quindi possa avere, in vario modo, una potenziale influenza sulle decisioni del Comitato Etico (5). In ambito europeo, per

evitare conflitti di interesse che possono nascere durante il processo di valutazione, alcune organizzazioni hanno deciso di istituire una politica interna specifica. Per esempio in Inghilterra *Code of Practice for Scientific Advisory Committees* sottolinea la necessità che i componenti del Comitato siano indipendenti dal gruppo proponente la ricerca; di conseguenza il proponente dovrà chiedere a tutti i componenti dello staff sperimentale di astenersi dal partecipare alla riunione di valutazione in modo da permettere una libera decisione del Comitato. Tali principi possono essere di difficile applicazione soprattutto nelle istituzioni più piccole, dove il numero di ricercatori che utilizza animali è limitato. Tale problematica può essere in parte superata se i componenti del Comitato sono al 50% membri interni e al 50% membri esterni.

Il processo di valutazione etica deve utilizzare un metodo trasparente, coerente e imparziale e il parere del Comitato dovrebbe essere obbligatorio e vincolante (altro punto nel quale si evidenziano disuguaglianze di comportamento tra i vari Comitati) per lo svolgimento degli esperimenti.

Anche il Comitato Nazionale per la Bioetica (CNB), organo consultivo della Presidenza del Consiglio dei Ministri, istituito il 28 marzo 1990, in un parere del 18 dicembre 2009 "Metodologie alternative, Comitati Etici e Obiezione di coscienza alla sperimentazione animale", oltre ad auspicare una spinta alle metodologie alternative alla sperimentazione animale sul modello delle 3R (riduzione, raffinamento e sostituzione), si sofferma sull'importanza deiComitati Etici per la Sperimentazione Animale, con particolare riferimento alla costituzione, alla composizione e alla rilevanza a livello sociale, auspicandone un coordinamento nazionale e internazionale. È stata in particolare sottolineata la mancanza di un organismo che fornisca una garanzia pubblica indipendente del rispetto delle norme.

Deve inoltre essere segnalata anche la recente istituzione di Comitati Etici Regionali (6-8) che si inseriscono come un'ulteriore tappa nel processo di valutazione etica del progetto di ricerca.

Quando detto finora, sarebbe dovuto essere suggellato e regolamentato nella nuova Direttiva europea, di modifica della Direttiva n.609/86/CEE, che si pensava, avrebbe previsto l'obbligatorietà di creare presso le varie istituzioni dei Comitati Etici. Nelle prime bozze di modifica della citata Direttiva era stato, infatti, inserito un articolo che prevedeva l'istituzione, presso gli stabilimenti di allevamento, fornitori e utilizzatori, di un "Organismo permanente di esame etico" che avrebbe dovuto svolgere attività di revisione dei progetti di ricerca secondo criteri di valutazione etico-scientifica e di consulenza in campo etico al personale che si occupa degli animali e nell'applicazione dei principi delle 3R. Nel corso dell'iter burocratico di approvazione, il concetto di Organismo di valutazione etica ha lasciato, però, il posto ad un Organismo preposto al benessere degli animali con compiti ben diversi da quelli precedentemente citati (9). Si tratterebbe di un organismo di natura essenzialmente tecnica preposto al benessere animale con funzione di consulenza e formazione. La valutazione etica e quindi la conseguente autorizzazione dei progetti di ricerca verrebbe effettuata solo a livello di organismi centrali, come accade a tutt'oggi. Nulla impedisce però al Governo italiano di introdurre, nel recepimento della Direttiva, Organismi che possano svolgere una funzione tecnica consultiva e di screening valutativo dei progetti, come erano stati indicati nel disegno di legge n. 53 del Sen. Tomassini (10). In questo, erano stati previsti due livelli di valutazione: il primo costituito da un Comitato locale che deve esprimere un parere preventivo, adeguatamente motivato sul progetto di cui il Ministero dovrà tenere conto ai fini del rilascio dell'autorizzazione.

Tale soluzione sembra essere, attualmente, la più efficace in quanto la funzione dei Comitati Etici sia istituzionali che regionali è essenzialmente quella di svolgere una sorta di screening, di filtro sui protocolli di ricerca, soprattutto alla luce dell'impossibilità di poter attuare un radicale e adeguato controllo sul territorio. Ritengo comunque che i Comitati Etici non possano

sostituire una valutazione etica e l'eventuale autorizzazione concessa a livello centrale nel rispetto sempre e comunque dei concetti espressi nel modello delle 3R.

Conclusivamente tutti gli esperimenti che richiedono l'uso di animali devono essere valutati dal punto di vista etico utilizzando un metodo trasparente, efficace e coerente con i requisiti e con gli standard nazionali e internazionali. In particolare si deve accertare che gli obiettivi scientifici non possano essere raggiunti senza l'utilizzo degli animali, che il modello prescelto sia appropriato, che gli animali utilizzati siano stabulati e gestiti secondo adeguati criteri e che il personale che gestisce e utilizza gli animali sia competente relativamente alle necessità fisiologiche ed etologiche della specie utilizzata.

Bibliografia

1. Van Rensselaer Potter. *Bioethics: bridge on the future*. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice-Hall; 1971.
2. Singer Peter. *Liberazione Animale*. Milano: Mondadori, 1991.
3. Commisione Europea. Direttiva 86/609/CEE del Consiglio del 24 novembre 1986 concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati Membri relative alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L358:1-28.
4. Italia. Decreto Legislativo 27 gennaio 1992, n. 116. Attuazione della Direttiva n. 86/609/CEE in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale-Serie Generale* n.40, 18 febbraio 1992.
5. Howard B, Nevalainen T, Perretta G. (Ed.). *The COST Manual of Laboratory Animal Care and Use*. USA: CRC Press; 2011.
6. Emilia Romagna. Legge Regionale 1 agosto 2002, n. 20. Norme contro la vivisezione. *Bollettino Ufficiale della Regione Emilia Romagna* n. 99, 8 settembre 2002.
7. Emilia Romagna. Legge Regionale 17 febbraio 2005,n.4. Modifiche alla Legge Regionale 1 agosto. *Bollettino Ufficiale Regione Emilia Romagna* n. 30, 18 febbraio 2005.
8. Friuli Venezia Giulia. Legge Regionale 11 febbraio 2010, n.3. Norme per la diffusione di metodologie alternative alla sperimentazione animale. *Bollettino Ufficiale Regionale* n.7, 17 febbraio 2010.
9. Comunità Europea. Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L1276 del 20 ottobre 2010.
10. Italia. Senato della Repubblica. Tomassini A, Malan L. Disegno di Legge n. 53. *Disposizioni per la protezione degli animali utilizzati a fini scientifici o tecnologici.* Atti Parlamentari, 29 aprile 2008. Senato della Repubblica Italiana XVI Legislatura (Ed.): 1-92.

ASSOCIAZIONI PROTEZIONISTICHE E NUOVA LEGISLAZIONE

Michela Kuan
Lega Anti Vivisezione e delegata per ECEAE ed Eurogroup for animals, Roma

Il fenomeno sperimentazione animale

La sperimentazione animale è un fenomeno italiano e globale, che non accenna a diminuire; infatti, nonostante lo scenario scientifico nazionale ed europeo sia sempre più rivolto alla promozione di metodi sostitutivi all'impiego di animali, i numeri legati alla sperimentazione sono stabili o addirittura in crescita, arrivando a 2.603.671 animali utilizzati in Italia dal 2007 al 2009 (1), 12 milioni di animali nei laboratori europei (2), dati sottostimati in quanto non includono invertebrati, forme fetali e animali utilizzati per i loro tessuti e organi.

Gli animali utilizzati in ambito sperimentale appartengono alle più svariate specie; vengono usati soprattutto topi, ratti e cavie, ma anche conigli, cavalli, pecore, uccelli, cani, gatti e primati non umani. Nella maggior parte dei casi gli animali provengono da stabilimenti fornitori, che allevano animali destinati esclusivamente ai laboratori e spesso geneticamente modificati, ma in altri casi, come per alcune specie di primati che hanno difficoltà ad adattarsi e riprodursi in cattività, devono essere prelevati in natura (3) fatto che comporta un impoverimento dell'ecosistema di origine, il finanziamento di tecniche di prelievo illegali e ovviamente condizioni di cattura, detenzione e trasporto gravemente impattanti sulla salute degli animali.

I campi di applicazione degli animali sono molteplici, la maggior parte viene impiegata per lo sviluppo di nuovi farmaci e apparecchiature, inoltre vengono impiegati per indagini legate alla ricerca di base, studi di tossicità, diagnosi di malattie, formazione universitaria, esperimenti bellici e test cosmetici (1).

La legge che regolamenta l'utilizzo di animali per fini scientifici è il Decreto legislativo 116/1992 (attuazione della Normativa europea 86/609 "Direttiva del Parlamento europeo e del Consiglio sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici"). Tale decreto nonostante sia datato, già si pronuncia in vari articoli e successive circolari a favore dei metodi alternativi e in maniera fortemente restrittiva verso il ricorso ad animali, ma nei fatti lascia la possibilità di eseguire qualsiasi procedura. Infatti, circa l'80% degli esperimenti viene autorizzata tramite un semplice meccanismo di silenzio assenso, non subendo nessun controllo o valutazione. La restante percentuale comporta il rilascio, da parte del Ministero della Salute, di un'autorizzazione specifica per il progetto in quanto preveda l'uso di animali vivi o in campo didattico o senza anestesia (rappresentano il 15% circa) (4), oppure l'utilizzo di cani, gatti e primati non umani.

Né il Decreto, né la Direttiva, attualmente, pongono limite assoluto al livello di sofferenza che è possibile infliggere durante gli esperimenti, infatti tramite autorizzazioni o deroghe è possibile effettuare anche procedure che causino dolore, sofferenza o angoscia intensi che potrebbero protrarsi e non possono essere alleviati; inoltre non prevedono controlli e ispezioni obbligatorie e valutazioni etiche nella fase di progettazione o al termine dell'esperimento, analisi che, invece, attraverso un meccanismo di costi-benefici, limiterebbero fortemente l'uso di animali ed eviterebbero il finanziamento di progetti che non apportino risultati utili alla ricerca. In aggiunta, non vengono presi in considerazione gli organismi geneticamente modificati, la cui regolamentazione è sempre più urgente, e le condizioni di stabulazione presentano requisiti legislativi minimi senza nessun arricchimento ambientale, infatti purtroppo

la Raccomandazione 2007/526/EC che invece indicava parametri migliorativi è rimasta spesso inascoltata in quanto non vincolante.

Si sottolinea come le condizioni di stabulazione possano influire anche sul risultato della procedura, infatti gli animali mantenuti nei laboratori spesso mostrano segni di stress psicologico, fisiologico e comportamentale (5) inoltre il mantenimento in condizioni non adeguate può predisporre l'animale all'insorgenza di patologie o alterazioni dello stato di salute in grado di influenzare i risultati, diventando variabili non deducibili a priori nell'esperimento.

Quadro normativo

In Italia il testo legislativo che regola l'utilizzo degli animali a scopi scientifici è il già ricordato Decreto n. 116 del 1992, che abroga la precedente legge del 1931 che consentiva il ricorso al modello animale "per il progresso della biologia e della medicina sperimentale". Tale Decreto, nell'articolo 4 comma 1, stabilisce che gli esperimenti "possono essere eseguiti soltanto quando, per ottenere il risultato ricercato, non sia possibile utilizzare altro metodo scientificamente valido, ragionevolmente e praticamente applicabile, che non implichi l'impiego di animali". Inoltre vi sono numerose norme restrittive sull'utilizzo degli animali nella ricerca: vieta gli esperimenti su cani, gatti e primati non umani (art.8 comma 1b), quelli che non prevedono anestesia (art.9) e quelli didattici (art.8 comma 3), ma vengono tutti riammessi con le norme derogatorie. Inoltre, si pronuncia in vari articoli e successive circolari in favore dei metodi alternativi sia in fase di progettazione che di autorizzazione. Lascia però aperte molte lacune nella protezione degli animali, tra cui: l'ammissione della ricerca di base, un sistema autorizzativo che all'80% si basa sulla semplice comunicazione, nessun accenno agli organismi geneticamente modificati, nessun meccanismo di controllo attraverso ispezioni o valutazioni retrospettive e considerazione solo di animali vertebrati vivi, escluse le forme fetali o embrionali.

Tra le lacune sopra citate, va sottolineata la gravità del sistema di autorizzazione delle procedure per semplice meccanismo di silenzio-assenso: se lo stabulario non riceve risposta entro un certo termine temporale, la procedura si può considerare autorizzata. Tale meccanismo è in totale contrasto con l'articolo 4 del Decreto che vieta il ricorso ad animali in presenza di un metodo alternativo e che quindi rende gli esperimenti che utilizzano animali residuali ed eccezionali; una pratica coerente dovrebbe basarsi sul principio opposto di silenzio-dissenso.

Le sanzioni sono irrisorie e non sufficientemente dissuasive e anche se stanno istituendosi i comitati etici all'interno di molti centri di ricerca, per lo più pubblici, questi sono costituiti solo da personale interno.

Le condizioni di stabulazione sono minime e non è previsto nessun arricchimento ambientale.

Note positive nel quadro legiferante in Italia sono il divieto di utilizzo per cani e gatti randagi e il divieto di recisione delle corde vocali per rendere afoni gli animali sottoposti a sperimentazione.

La nuova Direttiva europea sulla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali

La nuova Direttiva europea che regolamenta l'utilizzo e allevamento di animali destinati a fini sperimentali, è stata recentemente revisionata (8 settembre 2010). Un lungo iter di revisione, durato circa due anni, ha visto coinvolti tre autorità europee: Commissione, Consiglio dei Ministri e Parlamento, per un processo operato in co-decisione per potere legislativo condiviso.

La procedura di co-decisione prevede due «letture» successive in ciascuna delle due istituzioni (Consiglio e Parlamento); solo con un accordo, la legge può essere adottata. In caso contrario ci si rivolge a un comitato di conciliazione, formato da un numero uguale di rappresentanti del Consiglio e del Parlamento (TRIALOGO); quando il comitato ha raggiunto un accordo, il testo concordato viene trasmesso nuovamente al Parlamento e al Consiglio, affinché essi possano infine adottare la legge.

Il nuovo testo entrato in vigore il 9 novembre 2010 con il nome di "Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici" presenta molti punti innovativi rispetto a quello precedente. Infatti, una lunga prefazione e numerosi articoli legiferano in maniera più dettagliata rispetto allo scarno testo di quasi 25 anni fa. Tra i miglioramenti possiamo citare l'inclusione nelle statistiche delle forme fetali di mammifero, degli animali soppressi per ottenere tessuti o organi e un maggior controllo degli stabilimenti allevatori e fornitori di cui fino non si aveva accesso al registro degli animali**.** Inoltre, sono citate le banche dati, gli organismi geneticamente modificati, la possibilità di affidare gli animali sopravvissuti a privati, i metodi alternativi all'impiego di animali nella fase di progettazione/autorizzazione e formazione del personale competente, le ispezioni (anche se si è perso l'obbligo fondamentale che almeno una non fosse annunciata) e la classificazione del livello di dolore inferto durante le procedure sperimentali. È importante sottolineare come nessuno di questi punti sia un divieto o nei fatti una limitazione, ma aumenta, perlomeno, il regime di trasparenza.

Tra gli articoli negativi abbiamo: la possibilità di poter ricorrere, anche se in deroga, a gatti e cani randagi (in Italia il Decreto 116/1992 lo vieta), la possibilità di utilizzare specie in via d'estinzione e/o catturate in natura, il ricorso a soppressione per inalazione di anidride carbonica come metodo di uccisione di riferimento, definito dalla legge come "umanitario" ma che in realtà provoca alti e prolungati livelli di sofferenza, fatto riconosciuto scientificamente (6).

La tutela dei primati ha svolto un ruolo fondamentale durante l'iter di revisione della Direttiva, infatti varie forze politiche e animaliste si sono espresse e hanno lottato affinché venissero riconosciute particolari tutele ai primati non umani, specie utilizzate anche per gli esperimenti che comportano alti livelli di dolore e fortemente invasivi (tra cui investigazioni sul cervello, gli xenotrapianti e la ricerca di base (8-9), e divieti per le grandi scimmie, primati antropomorfi quindi Bonobo, Scimpanzé, Gorilla e Orango, vista la loro complessità comportamentale e la indubbia vicinanza genetica e capacità empatica simile all'uomo (7). Purtroppo, però, non sono stati ottenuti risultati rilevanti per la loro sorte e anche se il testo sembra prestare particolare attenzione nella tutela di queste specie, nei fatti, non modifica la situazione attuale.

A questa Direttiva, che regolamenta l'utilizzo degli animali in ambiti sperimentali e la conseguente stabulazione e metodi di soppressione, si affiancano normative specifiche che comportano, anch'esse, il ricorso al modello *in vivo*:

- Direttiva 1992/32/CEE concernente classificazione, imballaggio ed etichettatura delle sostanze pericolose: disciplina l'immissione sul mercato di ogni sostanza nuova potenzialmente pericolosa (10).
- Direttiva 1983/570 della CEE inerente le disposizioni legislative, regolamentari e amministrative relative alle specialità medicinali: prevede test pre-clinici e clinici per le specialità farmaceutiche (11).
- Direttiva 2003/15/CE (Comunità europea): regolamenta la formulazione e commercializzazione dei prodotti cosmetici (12).
- Regolamento n. 1907/2006/CE concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) (13).

Metodi alternativi

Esistono, e molti sono in fase di validazione, metodi alternativi alla sperimentazione animale come viene condotta attualmente. La definizione di tali metodi risale a un testo del 1959 (Russell e Burch, 1959), comunemente conosciuta come il Principio delle 3R, dall'inglese *Replacement*, *Reduction*, *Refinment. Replacement*, nel caso l'animale venga completamente sostituito, *Reduction* se si riesce ad attuare lo stesso esperimento con un numero inferiore di animali e la terza R, *Refinement* ovvero qualsiasi metodo o approccio che impedisce o riduce l'esistente o potenziale condizione di pena, dolore o qualsiasi condizione avversa all'animale, in un qualsiasi momento della sua vita, e ne aumenta il benessere. Tra i metodi sostitutivi, i soli alternativi in senso proprio, citiamo le tecniche *in vitro*, analisi chimiche, ricerca clinica (su materiale biologico umano, analisi genetiche, tecniche di *imaging*), studi epidemiologici, dimostratisi fondamentali nella lotta al cancro, modelli bioinformatici e nuove tecnologie come microcircuiti cellulari per indagini di tossico e farmaco cinetica o dinamica, organi bioartificiali e il *data sharing* (infatti la competitività aziendale in ambito chimico e farmaceutico, comporta, spesso, la mancanza di diffusione di dati). L'approccio verso tali metodi non deve essere concepito come rapporto 1:1 con quelli che si basano su modelli animali, cioè di sostituzione univoca (un organismo interno non può essere rappresentato da una semplice seppur corretta coltura *in vitro*), ma come una strategia integrata che prenda in esame un set di test e metta in relazione i risultati apportati da una varietà di metodi condotti. I metodi alternativi seguono un iter di validazione lungo, che impiega mediamente 10 anni per essere approvato, infatti il metodo deve essere riconosciuto a livello internazionale e validato dal Centro della Commissione Europea per la Validazione dei metodi alternativi alla sperimentazione animale (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ECVAM). È fondamentale che un metodo alternativo sia validato in modo da essere applicabile internazionalmente per evitare inutili ripetizioni e possibili effetti controproducenti nel numero di animali utilizzati.

Bibliografia

1. Italia. Tabelle, con relative note esplicative, concernenti i dati relativi al numero di animali utilizzati in Italia per fini scientifici o sperimentali nel triennio 2007/2009 (11A02787). *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 53, 5 marzo 2011.
2. Commissione europea. Report from the Commission to the Council and the European Parliament. Sixth Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in the Member States of the European Union SEC(2010) 1107. Bruxelles, 8 dicembre 2010. Disponibile all'indirizzo: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/reports_en.htm; ultima consultazione 9/2/2012.
3. V. Nijman *et al*. Endangered species research. *Primate conservation: measuring and mitigating trade in primates* 2011;13:159-61.
4. Kuan M. *La vivisezione in Italia; elaborazione LAV su dati Ministero della Salute 2006-2007.* Lega Antivivisezione, LAV. Disponibile all'indirizzo: http://www.lavbassano.it/dossier%20LAV%20Vivisezione%20dati%20Min%20%202006-2007.pdf; ultima consultazione 9/2/2012.
5. Balcombe JP. Laboratory environments and rodents' behavioural needs: a review. *Lab Anim*. 2006;40(3):217-35.
6. Makowska IJ, Weary DM. Rat aversion to induction with inhalant anaesthetics. *Appl Anim Behav Sci* 2009;119**:**229-35.

7. deWaal Frans BM. Putting the altruism back into altruism: the evolution of empathy. *Annu Rev Psychol* 2008;59:279-300.
8. Min TS, Han HJ, Park SH. Porcine Xenotransplantation to Primates. Asian-Aust. *J Anim Sci* 2010;23(11):1535-42.
9. Rudebeck PH, Buckley MJ, Walton ME, Rushworth MFS. A role for the macaque anterior cingulate gyrus in social valuation. *Science* 2006;313:1310-2.
10. Comunità Europea. Direttiva 92/32/CEE del Consiglio, del 30 aprile 1992 recante settima modifica della Direttiva 67/548/CEE concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* n. L 154 del 5 giugno 1992. Disponibile all'indirizzo: http://www.normativasanitaria.it/normsan-pdf/CEE/1992/25189_1.pdf; ultima consultazione 31/2/2012.
11. Comunità Europea. Direttiva 83/570/CEE 26 ottobre 1983, che modifica le direttive 65/65/CEE, 75/318/CEE e 75/319/CEE, per il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative relative alle specialità medicinali. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 332 del 28/11/1983.
12. Comunità Europea. Direttiva 2003/15/CE del Parlamento Europeo del 27 febbraio 2003 che modifica la Direttiva 76/768/CEE del Consiglio concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative ai prodotti cosmetici. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* n. L 66 del 11/03/2003. Disponibile all'indirizzo: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:066:0026:0035:it:PDF; ultima consultazione 31/2/2012.
13. Comunità Europea. Regolamento (CE) N. 1907/2006 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 18 dicembre 2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la Direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la Direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* n. L 136 del 29/05/2007. Disponibile all'indirizzo: http://reach.sviluppoeconomico.gov.it/files/Rettifica-20Regolamento-1907-2006.pdf; ultima consultazione 31/2/2012.

ITER PROCEDURALE PER LA VALIDAZIONE DELLE METODICHE ALTERNATIVE

Isabella De Angelis
Dipartimento Ambiente e Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

"All models are wrong, but some are useful"
(Gorge EP. Box, Robustness in the Strategy of Scientific Model, 1979)

Le aspettative rivolte allo sviluppo, validazione e accettazione normativa dei metodi alternativi (MA) sono recentemente aumentate, sia in ambito legislativo che, in generale, nell'intera comunità sociale. L'uso dei metodi alternativi, nella più ampia accezione definita dal principio delle 3R (Russel and Burch, 1959,), è stato incoraggiato dalla comunità scientifica sia per la maggiore attenzione rivolta al benessere animale, che per l'elevata qualità e accuratezza dei sistemi di saggio, spesso tradotta in una migliore capacita predittiva nei confronti della salute umana e dell'ambiente.

Secondo la definizione di Russel e Burch, è considerata alternativa alla sperimentazione animale qualsiasi procedura (metodo o tecnica, proposta o approccio) volta a: i) sostituirne un'altra che possa nuocere l'interesse degli animali (*replacement → sostituzione*), ii) ridurre il numero di animali richiesti (*reduction → riduzione*), o iii) migliorarla in modo da ottimizzare il benessere animale durante la procedura stessa o nel suo contesto (*refinement → perfezionamento*) (Figura 1). Il replacement, inoltre, è ulteriormente distinto in assoluto (l'animale non viene usato in nessuna fase dell'esperimento) e relativo (l'animale viene usato per un certo scopo, per esempio, per prelevare un organo o tessuto per preparare la coltura primaria), ma umanamente sacrificato, per limitarne al massimo la sofferenza.

È importante, sottolineare come la messa a punto di MA abbia fornito un significativo impulso alla ricerca e allo sviluppo di nuovi modelli e tecnologie. È stato, a questo proposito, recentemente proposto di chiamare i metodi che non si basano sull'uso di animali, non più alternativi, ma "avanzati".

Per tali ragioni il riferimento all'uso dei MA è ampiamente presente in numerosi dei recenti testi legislativi emanati dalla Comunità Europea (EC), come ad esempio il regolamento REACH (2006/1907/EC), il nuovo regolamento cosmetico (2009/1223/EC) o la recente Direttiva sulla protezione degli animali usati nella sperimentazione scientifica (2010/63/EU).

In questo ultimo testo il riferimento ai MA e ai principi di sostituzione, riduzione e perfezionamento è presente lungo tutto l'articolato; in particolare si dichiara espressamente che essi devono essere considerati ogni qual volta si attui una nuova procedura scientifica che preveda l'uso di animali (articoli 4 e 13)

Inoltre la Direttiva chiede agli Stati membri di farsi specifico carico dello….."*sviluppo e della convalida di approcci alternativi idonei a fornire lo stesso livello, o un livello più alto d'informazione di quello ottenuto nelle procedure che usano animali, ma che non prevedano l'uso di animali o utilizzino un minor numero di animali o che comportino procedure meno dolorose, e prendono tutte le misure che ritengono opportune per incoraggiare la ricerca in questo settore*" (articolo 47).

È definita alternativa alla sperimentazione animale una qualsiasi tecnica che:

Raffini	un metodo per ridurre la sofferenza imposta all'animale durante e dopo il saggio (***refinement***)
Riduca	il numero degli animali necessari all'esecuzione del saggio, mantenendo lo stesso livello di informazione (***reduction***)
Rimpiazzi	totalmente l'uso degli animali con tecniche *in vitro* e/o *in silico* (***replacement***)

Figura 1. Il principio delle 3R

Validazione

Un metodo alternativo è dato dalla combinazione di un sistema di saggio con un modello predittivo. Il sistema di saggio comprende tutte le procedure, incluso il protocollo sperimentale, necessarie ad ottenere informazioni su di una specifica sostanza. Il modello predittivo è una formula adatta a convertire i risultati generati dal sistema di saggio nella predizione dell'effetto(i) tossico(i). Esso è sviluppato sulla base di dati di riferimento il più possibile "robusti" o sulla comparazione con sostanze di riferimento di cui sia noto il profilo tossicologico.

La validazione, cioè il processo attraverso cui si verifica l'**affidabilità** (riproducibilità del metodo nel tempo e in laboratori diversi) e la **pertinenza** (significatività e utilità di una procedura per il fine prefissato) di un metodo per uno scopo specifico (Balls *et al*., 1990), è la "strada" obbligata attraverso cui devono passare tutti i MA prima di iniziare l'iter verso l'accettazione nelle legislazioni nazionali e internazionali.

Scopo del processo di validazione è verificare prestazioni, utilità e limitazioni di un saggio quando questo viene utilizzato in ambito regolatorio come supporto all'identificazione e alla valutazione del rischio.

I principi di base della validazione e le relative procedure sono stati definiti nella prima metà degli anni 90 da diversi organismi internazionali come ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) e OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*); questi principi hanno validità generale per tutti i metodi *in vivo in vitro* e *in silico*, nuovi o aggiornati, utilizzati per la valutazione del rischio per la salute umana e/o l'ambiente. Tra questi principi, alcuni dei più importanti sono:

- il razionale del metodo, la sua necessità scientifica e lo scopo regolatorio che si vuole ottenere devono essere ben chiari;
- la relazione tra il parametro saggiato, l'effetto biologico e la rilevanza tossicologica devono essere specificati;
- deve essere formalizzato e reso disponibile un dettagliato protocollo sperimentale del metodo (*Standard Operating Procedure* SOP);
- la variabilità, ripetitività e trasferibilità del metodo *tra* e *intra* laboratorio devono essere dimostrate utilizzando un significativo numero di sostanze chimiche, possibilmente codificate, rappresentative del tipo di sostanze per cui il metodo verrà utilizzato;

- le prestazioni del metodo devono essere valutate sulla base dei dati esistenti e in relazione all'organo bersaglio. Qualora si attui la sostituzione di un metodo normato con un MA dovrà, inoltre, essere valutata la capacità del metodo di coprire l'intervallo atteso di risposte (alta, moderata, bassa e negativa) in relazione al gruppo di sostanze chimiche su cui il saggio verrà applicato (dominio di applicabilità);
- i dati e gli esperimenti devono essere ottenuti/condotti secondo i principi di buona pratica di laboratorio "GLP" (*Good Laboratory Practice*).

È importante sottolineare che la formalizzazione del processo di validazione si è sviluppata contestualmente con il concetto di MA e con la necessità della sua accettazione regolatoria; viceversa, la maggior parte dei metodi *in vivo* presenti nella legislazione per accertare la sicurezza d'uso dei prodotti in commercio (sperimentazione regolatoria, secondo la definizione della 2010/63), non ha subto un analogo processo di valutazione dell'affidabilità e rilevanza, rendendo spesso difficile utilizzare i risultati di questi studi nella valutazione del rischio e/o nella comparazione con i dati *in vitro*.

Il processo di validazione è piuttosto lungo e rigido; infatti possono intercorrere fino a dieci anni (di cui circa 3 per la validazione del metodo, 2 per la compilazione del rapporto e la valutazione degli esperti e almeno altri 2 anni per l'accettazione normativa e l'armonizzazione internazionale) per il completamento delle 5 principali fasi che lo compongono (Balls *et al*., 1995). Queste fasi sono state elaborate nel corso di un approfondito dibattito tra numerosi esperti e più volte modificate in seguito all'esperienza acquisita.

Sinteticamente esse sono: a) **sviluppo** del saggio, dove per saggio si intende un sistema sperimentale in grado di generare informazioni relative agli effetti avversi di una sostanza chimica. I dati prodotti devono essere utilizzabili per la valutazione del rischio ed essere almeno, ma preferibilmente migliori, di quelli ottenuti con i metodi esistenti in modo da consentire un migliore livello di protezione per l'uomo e l'ambiente; b) **prevalidazione** mirata alla verifica della trasferibilità del metodo e all'ottimizzazione del suo protocollo; c) **validazione formale** coinvolgente più laboratori ed effettuata con sostanze chimiche codificate. I laboratori che partecipano allo studio di validazione (generalmente 3 o 4, ma dipende dal tipo di saggio) devono rispondere a dei requisiti minimi di esperienza per lo specifico saggio, competenza del personale, disponibilità strumentale, controlli di qualità degli iter procedurali, per l'archiviazione delle informazioni e il benessere degli animali (se il loro impiego è necessario); d) **valutazione di esperti indipendenti,** non direttamente coinvolti nelle precedenti fasi di sviluppo e validazione del metodo; e) avvio delle procedure per l'**accettazione regolatoria**, in particolare per il loro inserimento nelle Direttive Europee e/o nelle linee guida OECD o, nel caso di metodi per la valutazione dei prodotti biologici, nella Farmacopea Europea.

Tramite questo schema sono stati validati un certo numero di metodi alternativi, alcuni dei quali presenti nelle legislazioni internazionali (Tabelle 1 e 2).

Questo tipo di validazione, che prevede l'esecuzione di lavoro sperimentale per generare i dati mancanti all'adeguata valutazione della validità del metodo, viene definito "**validazione prospettiv**a" ed è quello più frequentemente utilizzato per normare i nuovi metodi.

Recentemente si è considerata la possibilità di stabilire dei criteri che consentissero di ottimizzare le informazioni esistenti su saggi non ancora validati ma consolidati nel tempo in ambiti non regolatori. Questo tipo di validazione, definita "**validazione retrospettiva**", viene effettuata tenendo conto di tutte le informazioni e i dati disponibili a supporto della sua validità, (inclusi risultati di precedenti studi di validazione), e non richiede lavoro sperimentale

Un terzo tipo di validazione, "**validazione comparativa o *catch-up validation***", consiste nel validare per comparazione o un metodo precedentemente validato, ma modificato per uno o più aspetti in maniera non sostanziale, o un metodo nuovo ma molto simile ad uno già validato.

Tabella 1. Principali metodi validati e relativi riferimenti normativi

Parametro	Saggio	Area 3R	Approvazione ESAC	Legislazione EU	Linee guida OECD
Irritazione cutanea	EpiDerm SIT and SkinEthic™ RHE	Sostituzione	5 novembre 2008	761/2009/EC Metodo B.46 allegato 440/ 2008/EC luglio 2009	n. 439 – luglio 2010
	EpiSkin®, EpiDerm® pelle umana ricostituita		27 aprile 2007		
Corrosione cutanea	EST-1000 pelle umana ricostituita	Sostituzione	12 giugno 2009	440/2008/EC Metodo B.40bis - giugno 2009	n. 431 – giugno 2009
	SkinEthic ™ pelle umana ricostituita		17 novembre 2006	440/2008/EC Metodo B.40bis - novembre 2006	n. 431 – Novembre 2006
	CORROSITEX pelle umana ricostituita		6 dicembre 2000 Studio ICCVAM	440/2008/EC Metodo B.40bis - maggio 2008	n. 435 – luglio 2006
	EpiDerm™ pelle umana ricostituita		21 marzo 2000	440/2008/EC Metodo B.40bis - aprile 2000	n. 431 – aprile 2004
	EPISKIN™ pelle umana ricostituita		3 aprile 1998	440/2008/EC Metodo B.40bis - aprile 2000	n. 431 – aprile 2004
	Misura della resistenza transepiteliale su pelle di ratto	Riduzione	3 aprile 1998 Da utilizzarsi solo in batterie di saggi	440/2008/EC Metodo B.40 - aprile 2000	n. 430 – aprile 2004
Irritazione oculare	*Bovine Corneal Opacity & Permeability* (BCOP)	Raffinamento	27 aprile 2007 Validazione retrospettiva (ICCVAM)	440/2008/EC	n. 437 – settembre 2009
	Isolated Chicken Eye (ICE)				n. 438 – settembre 2009
Tossicità acuta orale	*Acute toxic class method*	Riduzione	31 ottobre 2007	440/2008/EC Metodo B.1tris - aprile 2004	n. 423 – dicembre 2001
	Fixed dose procedure			440/2008/EC Metodo B.1bis – aprile 2004	n. 420 – dicembre 2001
	Up and down procedure				n. 425 – dicembre 2001
Assorbimento cutaneo	*In vitro Skin Absorption*	Sostituzione		440/2008/EC Metodo B.45 - maggio 2008	n. 428 – aprile 2004
Tossicità acuta acquatica	Strategia a tappe per ridurre l'uso dei pesci	Riduzione	21 marzo 2006	440/2008/EC	n. 126 – maggio 2010
Sensibilizzazione cutanea	*Local Lymph Node assay* (LLNA)	Riduzione		440/2008/EC Metodo B.42 - aprile 2004	n. 429 – aprile 2002
Fototossicità	3T3 *Neutral Red Uptake*	Sostituzione	3 novembre 1997 20 maggio 1998	440/2008/EC Metodo B.41 - aprile 2000	n. 432 – aprile 2004

segue

continua

Parametro	Saggio	Area 3R	Approvazione ESAC	Legislazione EU	Linee guida OECD
Genotossicità	Micronucleo su cellule di mammifero	Sostituzione	17 novembre 2006 Validazione retrospettiva		n. 487 – luglio 2010
Pirogeni	Saggi *in vitro* per i pirogeni	Sostituzione	21 marzo 2006	EDQM *European Pharmacopoeia*, metodo 2.6.30 Monocyte-activation test – marzo 2009	
Vaccini (potenza e sicurezza)	Vaccini per uso veterinario	Riduzione	3 giugno 2002	*European Pharmacopoeia monograph: Vaccines for veterinary use* (0062;2005)	
	ELISA test per l'erisipela	Sostituzione	28 giugno 2002	*European Pharmacopoeia*, 4.6; n. 01/2004:0064	
	ELISA test antitetanico (uomo)		6 dicembre 2000	*European Pharmacopoeia*, 2.7.8 *(general text)* – marzo 2003	
	ToBI test antitetanico (uomo)				

Tabella 2. Metodi scientificamente validati

Parametro	Saggio	Area 3R	Approvazione ESAC
Irritazione oculare	Rilascio di Fluoresceina	Sostituzione	10 luglio 2009 Validazione retrospettiva Da utilizzarsi solo in batterie di saggi
Produzione di anticorpi monoclonali	Metodi *in vitro* per la produzione di anticorpi monoclonali	Sostituzione	12 maggio 1998 Validazione retrospettiva
Ematotossicità	CFU-GM *in vitro* test per la valutazione della neutropenia	Sostituzione	21 marzo 2006
Tossicità riproduttiva (embriotossicità)	Cellule staminali embrionali	Sostituzione	1 maggio 2002

Nell'intento di abbreviare l'iter del percorso di validazione è stato proposto da ECVAM un approccio modulare (Hartung *et al*., 2004) che rendesse più flessibile e, conseguentemente, più rapido l'intero processo. Questo schema operativo, che prevede la suddivisione del percorso di validazione in 7 moduli distinti (definizione del saggio; variabilità intra-laboratorio; trasferibilità; variabilità tra laboratori diversi; capacità predittiva; campo di applicazione; standard di riferimento), risulta sicuramente più snello del precedente, pur mantenendo inalterato l'alto livello di qualità. L'intero processo di validazione è sottoposto alla valutazione degli esperti solo dopo aver raccolto tutte le informazioni necessarie dai singoli moduli, che possono essere eseguiti in maniera indipendente anche in parallelo. L'approccio modulare, inoltre, può essere applicato a diversi tipi di saggi e procedure, incluse quelle che utilizzano nuove tecnologie, come le tecnologie-*omiche*, indipendentemente dal fatto che si tratti di validazione prospettiva, retrospettiva o comparativa.

Data la complessità e il costo che uno studio di validazione comporta, essi sono generalmente condotti sotto la supervisione di organismi internazionali o entità governative

(ECVAM, ICCVAM, ZEBET, OECD), che si fanno carico di assicurare che tutte le principali fasi del processo siano adeguatamente pianificate ed eseguite. Un esperto di biostatistica, possibilmente indipendente allo studio, deve essere sempre presente durante tutte le fasi di lavoro, dalla programmazione alla successiva analisi dei dati. È importante sottolineare che, tanto più i risultati dello studio saranno chiari e ottenuti nel rispetto delle procedure, tanto più facile e veloce sarà l'accettazione normativa.

Intelligent Testing Stategies (ITS)

Sempre più frequentemente nei recenti contesti regolatori (in particolare nel regolamento REACH) si fa riferimento a "batterie di saggi", in cui diversi test sono combinati in maniera sequenziale per: a) aumentare l'efficacia e la predittività della valutazione del rischio; b) ridurre i costi e c) fare uso il più possibile di MA assicurando, nel contempo, una sufficiente protezione per l'uomo e l'ambiente. Tramite questo approccio è possibile integrare le valutazioni tossicologiche provenienti da molteplici fonti, facilitando così i processi decisionali inerenti a specifiche richieste regolatorie. Come discusso nel precedente paragrafo, il processo di validazione è però focalizzato sul singolo saggio ed è volto soprattutto all'identificazione del rischio piuttosto che alla sua valutazione; al momento non esistono linee guida specifiche per validare le strategie di saggi multipli (Kinsner-Ovaskainen *et al*., 2009). D'altra parte, divenendo sempre più evidente che la sostituzione diretta, 1 saggio *in vivo* → 1 saggio *in vitro* è difficilmente perseguibile, è urgente considerare lo sviluppo di specifici ITS in grado di combinare metodi *in vitro* e *in silico* per generare informazioni utili ai fini normativi. Sebbene siano reperibili in letteratura diversi ITS, costruiti in base a esigenze specifiche, pochi di essi hanno raggiunto la fase regolatoria o sono stati pubblicati in linee guida. In generale, all'interno di un ITS, si determina separatamente per ogni saggio la riproducibilità e la trasferibilità mentre la capacità predittiva viene valutata sul sistema nel suo complesso. La validazione formale è richiesta solo nel caso in cui l'ITS sostituisca completamente un saggio *in vivo* utilizzato a scopo regolatorio.

Ruolo di ECVAM

Nel 1991 è stato istituito dalla Commissione Europea un centro specifico deputato alla validazione delle alternative denominato ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ecvam.jrc.ec.europa.eu), con sede ad Ispra. ECVAM opera come coordinatore di studi internazionali di validazione, come punto di contatto per lo scambio di informazioni tra i ricercatori del settore, come provider del data base sui MA (che comprende anche i protocolli dei principali metodi *in vitro* validati). Inoltre favorisce il dialogo tra legislatori, industria, scienziati, organizzazioni dei consumatori e associazioni animaliste, verso lo sviluppo, la validazione e il riconoscimento internazionale dei MA. Il parere del suo Comitato Scientifico (ESAC, ECVAM *Scientific Advisory Commitee*), composto da esperti provenienti da tutti gli stati membri della EC, è ritenuto vincolante per la validazione di un metodo. ECVAM non è però il solo ente abilitato a dare il via libera all'inserimento in normativa di un MA; ad esempio l'OECD ha definito in un suo documento i criteri per la validazione e l'accettazione regolatoria dei MA (OECD, 2005).

Nella nuova Direttiva europea sulla sperimentazione animale i suoi compiti sono stati ulteriormente potenziati, in quanto identificato quale laboratorio di riferimento dell'Unione Europea per la validazione dei metodi alternativi.

Principali criticità del processo di validazione

Nonostante i progressi e gli sforzi fatti in questi ultimi anni per velocizzare il processo di validazione senza derogare sulla sua qualità, ci sono a tutt'oggi numerose barriere che limitano il riconoscimento e l'accettazione internazionale dei MA (Ahr *et al*., 2008) e che sono oggetto di acceso dibattito internazionale, tra questi è importante sottolineare:

- scarsa chiarezza degli scopi e delle applicazioni del metodo durante la fase di sviluppo;
- scarsa qualità e incompletezza nella pubblicazione dei dati di riferimento *in vivo* sia sugli animali che sull'uomo, essenziali per la determinazione della capacità predittiva;
- mancanza di standard di riferimento, cioè delle sostanze da utilizzare come controllo positivo e negativo;
- mancanza nella legislazione di saggi di riferimento per alcuni importanti endpoint tossicologici (irritazione respiratoria, immunotossicità, sensibilizzazione respiratoria) o, al contrario, presenza nella legislazione di più saggi relativi ad uno stesso endpoint, con conseguente difficoltà nell'identificazione del riferimento migliore;
- lunga durata del processo di validazione (2-10 anni);
- mancanza di adeguate risorse finanziarie per lo svolgimento degli studi di validazione;
- mancanza di criteri per la validazione delle nuove metodologie e/o dei nuovi approcci sperimentali in tossicologia (modelli *in silico*, tecnologie *–omiche*, modelli transgenici, strategie integrate di saggio).

È ormai evidente che la tossicologia del 21° secolo tende ad orientarsi verso l'individuazione di paramtri molecolari precoci e affidabili e a studiarne l'alterazione in seguito all'esposizione a sostanze tossiche. L'accettazione normativa di questi saggi rappresenta la sfida per il prossimo futuro.

Bibliografia

Ahr HJ, Alepee N, Breier S, Brekelmans C, Cotgreave I, Gribaldo L, *et al.* Barriers to validation. A report by European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing (EPAA) working group 5. *ATLA* 2008;36:459-64.

Balls M, Blaauboer B, Brusick D, Frazier J, Lamb D, Pemberton M, *et al.* Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures. *ATLA* 1990;18:313-37.

Balls M, Blaauboer BJ, Fentem JH, Bruner L, Combes RD, Ekwall B, *et al.* Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM Workshop 5. *ATLA* 1995;23:129-47.

Hartung T, Bremer S, Casati S, Coecke S, Corvi R, Fortaner S, *et al.* A modular approach to the ECVAM principles on test validity. *ATLA* 2004;32:467-72.

Kinsner-Ovaskainen A, Akkan Z, Casati S, Coecke S, Corvi R, Dal Negro G, *et al*. Overcoming Barriers to Validation of Non-animal Partial Replacement Methods/Integrated Testing Strategies: The Report of an EPAA–ECVAM Workshop. *ATLA* 2009;37:1-8.

OECD 2005. Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. ENV/JM/MONO(2005)14. *OECD Series on Testing and Assessment* 34, 96 pp. Paris, France.

Russel WS and Burch RL. *The principles of human experimental technique*. London: Methuen; 1959.

EVOLUZIONE DEL PRINCIPIO DELLE 3R

Augusto Vitale
Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Principio delle 3R

Nel 1959 Rex Burch e William Russell, membri della *University Federation of Animal Welfare* (UFAW), associazione tuttora molto attiva nel promuovere e diffondere la cultura del benessere animale, pubblicarono un libro intitolato *The principles of humane experimental technique.* In questo libro i due autori introdussero una serie di raccomandazioni, che i ricercatori dovrebbero mettere in pratica, per favorire una sperimentazione animale maggiormente attenta al benessere degli animali da laboratorio (Russell & Burch, 1959).

Questa serie di raccomandazioni, note come il Principio delle 3R, fa riferimento a tre fondamentali concetti metodologici: rimpiazzare (*replacement*), ridurre (*reduction*) e rifinire (*refinement*). Inizialmente, si suggerisce al/la ricercatore/trice di verificare la possibilità di rimpiazzare il proprio modello animale con un metodo alternativo, non senziente; quindi si chiede di ridurre il più possibile il numero di soggetti sperimentali da utilizzare in quel particolare protocollo sperimentale; infine bisogna rifinire le condizioni sperimentali in modo da ridurre il più possibile la sofferenza imposta agli animali.

In questo contributo analizzerò le singole 3R più in dettaglio, e le nuove interpretazioni che sono state proposte con il passare del tempo. Illustrerò quindi le possibili interazioni fra le 3R, e i possibili problemi concettuali e metodologici che possono sorgere. Concluderò con un accenno alla presenza del Principio delle 3R nel testo della nuova Direttiva 2010/63 per la protezione di animali utilizzati in procedure scientifiche.

Rimpiazzare (*Replacement*)

Questo concetto si riferisce alla possibilità di sostituire il modello animale con un modello alternativo. Nell'accezione originale del termine, Russell e Burch intendevano l'utilizzo di materiale non-senziente, al posto del modello animale. Infatti, i due autori descrivono una serie di metodi alternativi come, per esempio, piante, micro-organismi, sistemi chimici e fisici non viventi. Nel tempo questo concetto si è evoluto, assumendo diverse sfaccettature. In generale oggi si distingue un rimpiazzo parziale (*partial replacement*) e un rimpiazzo completo (*total replacement*), concetti tra l'altro già suggeriti da Russell e Burch nel loro testo originale. Nel primo caso il modello animale originario viene sostituito da un modello che prevede l'utilizzo di una specie caratterizzata da una minore complessità del sistema nervoso, rispetto all'originale (un topo per una scimmia, un pesce per un topo, un invertebrato per un pesce, ecc.); oppure il modello animale viene sostituito da un modello non animale, in una certa fase del protocollo sperimentale. Ancora, allargando la prospettiva, si sostituisce un intero programma di sperimentazione animale (per esempio, come nel caso dei test sui cosmetici). In *absolute replacement* invece, il modello animale è stato completamente eliminato dal protocollo sperimentale.

Il concetto di *replacement* ha a che fare con due tipi di domande: i) che cosa viene esattamente sostituito? ii) nel caso dovessimo proporre un'alternativa all'esperimento animale, quali sono le condizioni che devono essere rispettate? Potremmo voler ottenere dal metodo

alternativo gli stessi risultati ottenuti in precedenza con il metodo tradizionale, per esempio come nel caso di un test utilizzato per dimostrare l'innocuità di un certo farmaco. Potremmo, oppure, ragionare in modo inverso, e modificare il fine o i risultati attesi, in modo da meglio utilizzare il metodo alternativo proposto. È necessario però porre l'accento sul fatto che le prime considerazioni sull'utilizzo o meno di una tecnica alternativa all'uso di un modello animale, dovrebbero sempre riguardare la scientificità dell'esperimento proposto originariamente e il suo specifico fine.

Riduzione (*Reduction*)

Questo concetto si riferisce alla riduzione del numero di soggetti sperimentali utilizzati in un particolare protocollo sperimentale. Russell e Burch si riferirono alla riduzione del numero degli animali utilizzati per ottenere una quantità di dati numericamente significativi di sufficiente precisione. È quindi importante notare che i due autori già sottolineavano il concetto che la riduzione del numero dei soggetti non può determinare una minore, oppure inefficace, potenza statistica. È essenziale quindi, qualora si voglia ridurre il numero dei soggetti sperimentali, ricercare il consiglio di un esperto in statistica, qualora il ricercatore, o la ricercatrice, non si senta sicuro su come operare. Mediante uno studio pilota si può determinare, per esempio, il numero di variabili estranee al protocollo che possono influenzare la validità del risultato, e come tale variabilità può richiedere un campione di una certa consistenza numerica. Questo tipo di informazioni può quindi essere utilizzato per calcolare con precisione il numero di soggetti sperimentali necessari per ottenere risultati significativi in quel particolare caso.

Un altro modo per ridurre il numero di soggetti sperimentali utilizzati da diversi laboratori è quello di armonizzare il più possibile, a livello internazionale, le metodologie utilizzate sia per test di tossicità che per ricerche di tipo biomedico. Ciò ridurrebbe significativamente la possibilità di ripetere gli stessi test in differenti Paesi. Inoltre, i risultati non significativi dovrebbero essere resi disponibili, in modo da evitare il ripetersi di test i cui risultati non sono pubblicati.

Un'interessante evoluzione del concetto di *reduction* è che può essere pensato come applicabile non solo a livello del singolo esperimento, o di un particolare progetto di ricerca. Infatti, lo si può applicare a livelli più generali, dove però tale applicazione richiede uno sforzo diverso e alle volte più complesso. Quindi, possiamo distinguere:

i) *Riduzione intra-sperimentale:* riguarda il numero di animali all'interno di ogni singolo esperimento, oppure dei singoli protocolli all'interno di un esperimento più complesso. La possibilità di ridurre dipende dalla domanda scientifica posta inizialmente e dal tipo di metodologia necessaria per rispondere a tale domanda. Ne segue che la possibilità di ridurre o no, varia da esperimento a esperimento. Comunque, si può ridurre migliorando il disegno statistico, eseguendo studi pilota, mediante un'analisi retrospettiva di dati ottenuti in precedenza. È importante ribadire che quest'analisi è da condurre specificatamente per ogni singolo esperimento si voglia eseguire.

ii) *Riduzione sovra-sperimentale*: si attua applicando il concetto in modo più generale al modo di fare ricerca con gli animali, a livello nazionale. Tra gli esempi di quest'azione possono essere menzionati corsi di aggiornamento per il personale sui metodi statistici e sui vari tipi di disegni sperimentali, la possibilità di utilizzare i soggetti sperimentali come controllo di se stessi. In questo secondo caso rientrano anche l'azione dei comitati etici, la possibilità di scambiarsi informazioni fra differenti gruppi di ricerca, l'ottimizzazione dei programmi di riproduzione.

iii) *Riduzione extra-sperimentale*: in questo caso la riduzione si ottiene mediante un'evoluzione della pratica sperimentale a livello internazionale, mediante l'armonizzazione delle regole

nazionali alla sperimentazione animale tra i Paesi Europei, Stati Uniti e Giappone (paesi nei quali questi tipi di studi sono maggiormente frequenti).

Rifinire (*Refinement*)

Anche il concetto di *refinement* si è evoluto nel tempo. Russell e Burch avevano già indicato nel loro testo che rifinire le procedure sperimentali voleva dire non solo occuparsi del benessere animale durante un esperimento (evitare casi di *direct inhumanity*), ma anche migliorare la qualità di vita di un individuo durante tutte le procedure che accompagnano la vita di un animale in cattività (evitare casi di *contingent inhumanity*). In questo senso, nel 2005 Buchanan-Smith e colleghi hanno proposto una nuova definizione di *refinement:* "Any approach which avoids, alleviates or minimises the actual or potential pain, distress and other adverse effects suffered at any time during the life of the animals involved, or which enhances their well-being as far as possible" (Buchanan-Smith *et al.,* 2005). È interessante notare come questa definizione sia stata in parte ripresa dalla nuova Direttiva europea sulla tutela degli animali utilizzati in procedure scientifiche (European Commission, 2010). Ciò che è particolarmente rilevante in questa definizione è il riferimento a uno sforzo attivo e necessario per il miglioramento dello stato di benessere dell'animale sperimentale, dove benessere non è semplicemente assenza di malessere. Per esempio l'uso di arricchimenti ambientali, che ora è esplicitamente contemplato dalla nuova Direttiva europea 2010/63 (Annex III), è un modo collaudato di fornire all'animale un maggior controllo dell'ambiente, e stimolare la manifestazione di comportamenti che sono inerenti all'ecologia ed etologia della specie utilizzata (Olsson & Dahlborn 2002; Stewart & Bayne, 2004).

Per quanto riguarda l'utilizzo di arricchimenti ambientali, generalmente si pensa che le condizioni di vita degli animali in cattività saranno tanto migliori quanto più a questi è data la possibilità di esprimere comportamenti osservati in condizioni naturali. Tuttavia, nonostante questo sia un punto di vista significativo, è bene anche pensare che non è sempre così. Infatti, considerando che parte del repertorio comportamentale di una specie può essere modificata da condizioni ambientali contingenti, e in più tenendo presente la flessibilità comportamentale, per esempio, dei mammiferi, ne segue che animali in cattività possano essere diversi da conspecifici che vivono nell'ambiente di origine. In pratica, ci si può attendere che le necessità comportamentali di un individuo in cattività siano in parte diverse da quelle di un conspecifico selvatico. Inoltre è necessario, quando si tratta di migliorare la qualità di vita di un particolare individuo, tenere presente la sua storia personale. Per esempio, un particolare arricchimento ambientale, adottato in una certa colonia di primati, potrebbe non essere valido per una diversa colonia, appartenente alla stessa specie. L'arricchimento ambientale deve essere tarato su ogni singola situazione, affinché possa essere realmente efficace. D'altra parte, attenzione deve essere fatta nel non creare situazioni ambientali troppo eterogenee fra colonie diverse, con il rischio di compromettere la ripetibilità dei dati. Come al solito, un equilibrio deve essere trovato fra validità del dato scientifico e benessere degli animali utilizzati. Un ulteriore aspetto per misurare l'efficacia di un particolare arricchimento si basa sulla misura del grado di motivazione di particolari individui a usufruire di uno specifico arricchimento. Adottando analisi derivate da teorie di micro-economia, si può misurare la quantità di lavoro che un individuo è disposto a compiere per usufruirne: maggiore è il lavoro compiuto, maggiore è il beneficio atteso da parte dell'animale (Mason *et al.,* 1998).

Un altro esempio di *refinement* delle procedure che negli ultimi anni si è sempre più diffuso nei laboratori di ricerca è quello del *positive training*, o rinforzo positivo. In questo caso, sfruttando le potenzialità dell'apprendimento associativo e mediante l'offerta di premi alimentari, all'animale viene insegnato a cooperare nelle procedure routinarie sperimentali. Il

risultato di questa metodologia, per esempio, è l'offerta spontanea di un arto da parte di una scimmia per una certa inoculazione, oppure lo spostamento non forzato di un individuo da una gabbia all'altra (Laule *et al.*, 2003; Prescott & Buchanan-Smith, 2003).

Interazioni tra le 3R

Le 3R non sono da considerare indipendenti fra loro. In pratica, i tre concetti possono interagire sia in maniera positiva sia in maniera negativa.

Si possono immaginare casi nei quali l'applicazione di une delle tre Rs può avere un impatto positivo su una o tutte e due le altre R. Per esempio, un programma educativo dedicato al personale tecnico che si occupa della manutenzione degli animali, dove siano enfatizzati i bisogni specie-specifici di animali sperimentali, può portare a una maggiore attenzione verso lo stato di benessere. Ciò porta a un'automatica applicazione del concetto di *refinement*. Conseguentemente, grazie a uno stato generale di benessere più elevato, gli animali affrontano con minore stress una particolare condizione sperimentale: ciò porta ad una minore variabilità dei risultati sperimentali dovuta agli effetti stressanti dell'esperimento stesso. Una minore variabilità dei risultati sperimentali apre, a sua volta, alla possibilità di ridurre il numero degli animali utilizzati per quel particolare protocollo sperimentale (*reduction*), conservando comunque la necessità di applicare test statistici adeguati.

Un altro esempio riguarda l'interazione fra *replacement* e *refinement.* Abbiamo in precedenza visto come, nel caso di una sostituzione parziale in un particolare esperimento (*partial replacement*), si può pensare di sostituire una particolare specie con un'altra caratterizzata di un minore sviluppo del sistema nervoso (per esempio un topo per una scimmia). Nonostante sia necessario essere prudenti nell'affermare che un topo abbia un livello di sofferenza minore di quello di una scimmia, se ciò fosse vero applicheremmo in maniera quasi automatica, anche il concetto di *refinement*, perché il livello di sofferenza imposto all'animale sarebbe minore. Indubbiamente, la sostituzione di un vertebrato con un invertebrato renderebbe quest'esempio ancora più appropriato.

Spostandoci su un livello più globale, uno sforzo verso un'armonizzazione internazionale dei protocolli sperimentali che riguardano i test di sicurezza per i farmaci può portare una diminuzione dei test che sono compiuti nei singoli Paesi. Inoltre, lo scambio di tecniche e metodologie meno invasive, che prevedono l'applicazione di alternative all'uso di modelli sperimentali senzienti (*sharing best practices*), può ridurre il livello generale di sofferenza imposto agli animali da laboratorio. Quindi un'armonizzazione internazionale sulle metodologie utilizzate può facilitare l'applicazione sia del concetto di *reduction* sia di *refinement.*

Ci sono alcuni casi nei quali le 3R entrano in conflitto. Per esempio, ciò succede quando bisogna validare un certo metodo alternativo, oppure verificare l'efficacia di una tecnica particolare che ha lo scopo di diminuire lo stato di sofferenze dell'animale sperimentale. Quando non ci sono a disposizione dati già esistenti ai quali fare riferimento, si necessita di comparare i due metodi o le due tecniche (tradizionali *vs* alternative). In questo caso, entrano in conflitto i concetti di miglioramento della procedura sperimentale (*refinement*) e riduzione del numero di soggetti sperimentali (*reduction*). Un altro possibile conflitto deriva dell'utilizzo di metodi telemetrici per la rilevazione di dati fisiologici a distanza. Tali metodi prevedono spesso l'inserimento di una sonda sotto cute, o nella cavità viscerale dell'animale. Inoltre, possono essere raccolti molti dati da un numero relativamente minore di individui. Ecco, quindi che sia la condizione di miglioramento delle condizioni sperimentali, che di riduzione degli individui, sono soddisfatte. D'altra parte però l'impianto di una sonda, specialmente quando inserita nella cavità viscerale, richiede un intervento chirurgico significativamente invasivo. Inoltre,

specialmente nel caso di piccoli roditori, il peso della radiotrasmittente può causare disagio fisiologico e fisico. In questo caso quindi sottoponiamo un individuo a una condizione di notevole disagio, anche se con la prospettiva di diminuire globalmente il numero di individui utilizzati.

Quale R preferire?

Ogni singola procedura, protocollo e ricerca sperimentale rappresenta un caso a sé stante ed è quindi possibile, come abbiamo visto, che diverse R entrino in conflitto fra loro. Come ci si deve comportare in questi casi?

La legislazione corrente non indica una regola precisa da seguire, che aiuti a dare maggiore peso ad una R invece che un'altra. Un'indicazione in tale senso però ci è offerta dalla normativa nazionale britannica, dove viene data maggiore importanza al miglioramento delle procedure sperimentali, che non alla riduzione del numero di individui utilizzati in un certo protocollo (Home Office, 2000). Ciò vuol dire che la sofferenza provata dal singolo individuo è il valore più importante del quale tenere conto: provocare maggior sofferenza ad un numero relativamente minore di individui non è accettabile. Se si trattasse di un lieve aumento della sofferenza, utilizzando un numero significativamente minore di individui, allora la riduzione potrebbe essere accettata. Bisogna attuare un'analisi costo-beneficio e, in generale e banalmente, adottare decisioni d buonsenso riguardo a quel particolare protocollo sperimentale. È importante che problemi generati dall'applicazione del Principio delle 3R siano discussi, e sia offerta una qualche sorta di guida per poterli risolvere.

Difficoltà nell'applicare il Principio delle 3R

Vi sono casi nei quali è più difficile applicare il Principio delle 3R. Si può citare a questo proposito l'utilizzo di specie animali per ottenere modelli per studiare il morbo di Pakinson) (Manciocco *et al.*, 2009; Vitale *et al.*, 2009). In alcuni protocolli sperimentali per questo tipo di studi lo sperimentatore ha bisogno di un modello animale che replichi la serietà della malattia. In questo caso la procedura può entrare in diretto conflitto con il concetto di *Refinement*. In un protocollo sperimentale di questo tipo diventa necessario identificare con precisione quale tipo di *endpoint*, il più precoce possibile, è essenziale per rispondere alla specifica domanda posta dall ricerca. Inoltre, nei limiti imposti dalla metodologia scelta, bisogna operare per limitare il più possibile il disagio creato agli animali. Per esempio, in uno studio di Wichmann e colleghi, tre macachi resi (*Macaca mulatta*) sono stati iniettati con MPTP (una tossina che provoca i sintomi tipici del morbo di Parkinson) (Wichmann *et al.*, 2001). Alcuni individui mostrarono distinti segni di guarigione, rendendo così necessaria una nuova somministrazione di tossina. Ciò è contro il concetto di *Refinement*, e una soluzione poteva essere quella di aumentare il numero di soggetti, per limitare il numero di individui che potenzialmente avrebbero necessitato di ulteriore trattamento Però, ciò sarebbe invece stato un caso di mancata applicazione del concetto di *Reduction*. Quindi, non sempre il Principio delle 3R è di pronta applicazione.

Principio delle 3R e legislazione

Il 20 ottobre 2010 è stato finalmente pubblicato sull'Official Journal of European Union, il testo della nuova Direttiva europea sulla protezione degli animali utilizzati per scopi scientifici. Circa dieci anni fa fu evidente che la Direttiva europea 86/609/EEC fosse obsoleta, ed era necessario rinnovarla, in base alle nuove conoscenze scientifiche, e alle nuove consapevolezze etiche. Il 5 novembre 2008 la Commissione Europea ha adottato una proposta per rivedere la Direttiva con lo scopo principalmente di Minimizzare il numero di animali usati nelle procedure scientifiche; migliorare in modo significativo il trattamento degli animali ancora necessari per studi di tossicologia e ricerca biomedica negli Stati Membri dell'Unione Europea; migliorare la qualità della ricerca condotta negli Stati Membri dell'Unione Europa; assicurare uno standard elevato di salute umana e animale, e di protezione dell'ambiente.

Il Principio delle 3R è parte integrante della nuova Direttiva. Vale la pena citare parte dell'Articolo 4, che ha come ha come titolo: *Principle of replacement, reduction and refinement. Paragraph 1: "1. Member States shall ensure that, wherever possible, a scientifically satisfactory method or testing strategy, not entailing the use of live animals, shall be used instead of a procedure". Paragraph 2: "Member States shall ensure that the number of animals used in projects is reduced to a minimum without compromising the objectives of the project. Paragraph 3. "Member States shall ensure refinement of breeding, accommodation and care, and of methods used in procedures, eliminating or reducing to the minimum any possible pain, suffering, distress or lasting harm to the animals"*. Inoltre una conoscenza del Principio delle 3R, e la volontà di applicarlo, viene richiesto tra le informazioni da allegare per la autorizzazione di un progetto di ricerca (Annex VI), e deve essere parte del patrimonio di conoscenze che il personale che lavora con gli animali deve possedere (Annex V)

Conclusioni

Il Principio delle 3R rimane tuttora uno strumento valido e importante per un approccio più etico alla sperimentazione animale, nonostante con il tempo i tre concetti si siano modificati rispetto alla formulazione originale. Tracce di quest'evoluzione si possono trovare nel testo della recente Direttiva 2010/63, dove le 3R sono diventate parte integrante ed esplicita delle norme che regolano la sperimentazione animale in Europa. Mi piace però porre l'accento qui sul fatto che il Principio delle 3R, più che essere semplicemente uno strumento metodologico e legislativo a tutela del benessere degli animali da laboratorio, deve essere anche inteso come una *forma mentis*. Il ricercatore o la ricercatrice devono porsi il problema di come affrontare più eticamente l'utilizzo di un modello animale che hanno a disposizione. Inoltre, e ciò è molto importante, non bisogna fermarsi all'applicazione della prima R (*Replacement*). Spesso la sostituzione del modello animale non è ancora possibile anche se, per certi versi, è la possibilità più attraente. Nell'impossibilità di operare in questo senso, bisogna in ogni caso analizzare e cercare di applicare *Reduction* e *Refinement*. Ho cercato, infatti, di mostrare come le 3R non sono disgiunte fra loro, ma interagiscono in diversi modi. Adottando questo tipo di considerazioni metodologiche si può migliorare significativamente la qualità sia etica che scientifica del lavoro sperimentale.

Bibliografia

Buchanan-Smith HM, Rennie AE, Vitale A, Pollo S, Prescott MJ, Morton DB. Harmonising the definition of refinement. *Animal Welfare* 2005;14:379-84.

Consiglio delle Comunità Europee. Direttiva 86/609/CEE del 24 novembre 1986 concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri relative alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici (86/609/CEE). *Gazzetta Ufficiale del Consiglio d'Europa* L358 del 18 dicembre 1986, p. 1-28. Disponibile all'indirizzo: www.uniss.it/documenti/sppis/Dir_86_609_CEE.pdf; ultima consultazione 9/2/2012.

de Boo MJ, Rennie AE, Buchanan-Smith HM, Hendriksen CFM. The interplay between replacement, reduction and refinement: considerations where the three Rs interact. *Animal Welfare* 2005;14:327-32.

European Commission. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of 22 September on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal European Union* 2010;276:33-79.

Home Office. *Guidance on the operation of the animals (Scientific Procedures Act) 1986*. London: TSO; 2000.

Italia. Decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 116. Attuazione della Direttiva n. 86/609 in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale – Supplemento ordinario* n. 40, 18 febbraio 1992.

Laule GE, Bloomsmith MA, Shapiro SJ. The use of positive reinforcement training techniques to tnhance the care, management, and welfare of primates in the laboratory. *Journal Applied Animal Welfare Science* 2003;6:163-73.

Manciocco A, Chiarotti F, Vitale A, Calamandrei G, Laviola G, Alleva E. The application of Russell and Burch 3R principle in rodent models of neurodegenerative disease: The case of Parkinson's disease. *Neuroscience& Biobehavioural Review* 2009;33:18-32.

Mason G, McFarland D, Garner J. A demanding task: using economic techniques to assess animal priorities. *Animal Behaviour* 1998;55:1071-5.

Olsson IAS, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of environmental enrichment. *Laboratory Animals* 2002;36:243-70.

Prescott MJ, Buchanan-Smith HM. Training nonhuman primates using positive reinforcement techniques. *Journal Applied Animal Welfare Science* 2003;6:157-61.

Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*. Wheathampstead, England: Universities Federation for Animal Welfare; 1959 (reprinted in 1992).

Stewart KL, Bayne K. Environmental enrichment for laboratory animals In: Reuter JD, Suckow MA (Eds.). *Laboratory animal medicine and management*. Ithaca, New York: International Veterinary Information Service; 2004.

Vitale A, Manciocco A, Alleva E. The 3R principle and the use of non-human primates in the study of neurodegenerative diseases: the case of Parkinson's disease. *Neuroscience & Biobehavioural Review* 2009;33:33-47.

Wichmann T, Kliem MA, DeLong MR. Antiparkinsonian and behavioral effects of inactivation of the substantia nigra pars reticulata in hemiparkinsonian primates. *Experimental Neurology* 2001;167:410-24.

DIRETTIVA 2010/63: CONSEGUENZE PER IL RUOLO DEL MEDICO VETERINARIO

Fabio Faiola
Dipartimento di Medicina Molecolare, "Sapienza" Università di Roma, Roma

Obiettivi della Direttiva

Il decreto legislativo 116 del 27 gennaio 1992, sulla base della Direttiva comunitaria 86/609 attualmente disciplina tutte le attività connesse all'utilizzo degli animali vivi, con finalità scientifiche, allo scopo di tutelarne il benessere ed evitare o limitare al minimo possibile dolore, angoscia, sofferenza o danni durevoli, che potrebbero derivare dalle procedure effettuate.

Nel decreto legislativo116 vengono messi in evidenza: la procedura, il modello animale, il concetto di esperimento, la provenienza degli animali.

Il fine della legge è di assicurare il benessere agli animali, l'oggetto di questa è la procedura sperimentale con l'insieme delle sue fasi, delle tecnologie utilizzate, e delle capacita professionali di tutti coloro che entrano a far parte delle procedure.

La nuova Direttiva EU 63/2010, una volta recepita dagli stati membri, sostituirà la precedente Direttiva del 1986.

Gli articoli della nuova Direttiva, sono decisamente orientati affinché ci sia un aumento dei comportamenti di tutela dell'animale e delle procedure atte a diminuirne lo stress sperimentale, creare un'armonizzazione della legislazione tra gli stati membri affinché nell'ambito dell'Unione venga garantito anche un buon funzionamento del mercato interno con pari condizioni tra ricercatori e aziende.

Rispetto a quanto previsto dal Decreto legislativo 116, la nuova Direttiva europea, indica quali sono i requisiti previsti, ma i metodi per conseguire tali requisiti vengono poi decisi e adottati dalle autorità competenti di ogni singolo Stato Membro, liberi di applicare misure nazionali più restrittive, solo nel caso queste siano già adottate precedentemente.

La nuova Direttiva dovrebbe prevedere una più armonica regolamentazione, in ambito di tutti gli Stati Membri, delle leggi che verranno applicate nell'ambito della ricerca che prevede l'utilizzo di animali vivi.

I requisiti richiesti saranno adottati in tutti i Paesi e l'autorizzazione di un dato progetto e la sua valenza essere la stessa in ogni stato della EU in quanto le restrizioni saranno equivalenti per ogni Paese.

Chiaramente definiti dalla Direttiva sono i modelli animali utilizzabili, con particolari vincoli riguardanti l'uso di primati non-umani, cani, gatti, animali in via d'estinzione.

Si presta particolare attenzione:

alle fasi delle procedure, ad incoraggiare le metodologie alternative (a livello ministeriale particolare attenzione è riservata alla ricerca sui metodi alternativi, che si sta svolgendo all'Istituto Zooprofilattico di Brescia) *in vitro* e in silico (simulazioni biologiche informatiche), alla classificazione delle classi di gravità, ai metodi utilizzati per l'eutanasia, al riutilizzo e all'eventuale reintroduzione seguendo un programma di reinserimento.

Inoltre, particolare attenzione, viene data alla richiesta delle competenze necessarie del personale coinvolto nella ricerca e alla sua formazione.

Ogni progetto prevede un'attenta valutazione per l'ottenimento dell'autorizzazione, che è ora obbligatoria per qualsiasi progetto, anche attraverso valutazioni retrospettive e di natura non

tecnico – scientifica. La valutazione costi/benefici sarà a cura di persone non responsabili del progetto,in modo da mantenere una effettiva indipendenza e rendere l'attività sperimentale accessibile e "leggibile" da parte di un contesto esterno a quello degli addetti ai lavori.

L'Italia sembrerebbe orientata a recepire la Direttiva UE in maniera più rigida rispetto agli altri Paesi europei, mantenendo norme, attualmente vigenti, più rigide di quanto richiesto (come il divieto all'utilizzo di animali randagi), riconoscendo l'animale un essere pienamente "senziente", nello spirito del Trattato di Lisbona (13 dicembre 2007).

Individuazione delle figure professionali coinvolte nella sperimentazione

Come la 86/609, anche la nuova Direttiva 63/2010 del Parlamento Europeo, prevede alcune figure professionali che rivestono un ruolo di rilievo nello svolgimento di pratiche di ricerca con animali vivi.

Il personale che attende, a qualsiasi titolo, alla sperimentazione animale, viene nominato negli articoli: 23, 24, 25, e 26. Tra costoro dovrebbe vigere un metodo lavorativo sinergico, affinché si possa svolgere una efficiente e armonica cooperazione..

- Medico veterinario responsabile per il benessere animale.
- Responsabile dello stabulario,
- Responsabile del progetto di ricerca e/o degli esperimenti
- *Animal- welfare body*

Medico veterinario

Compito del veterinario è quello di porsi quale intermediario tra il ricercatore e le reali esigenze degli animali utilizzati, affinché venga tutelato il benessere animale.

Il controllo delle condizioni di salute degli animali e l'assistenza sanitaria devono essere assicurati da un Medico Veterinario, che effettua funzioni di consulenza sul benessere degli animali nelle diverse fasi, ivi comprese quelle dell'impiego e della stabulazione, in base ad un programma di interventi.

Il *Veterinario*, deve in particolare:

- controllare il benessere e le condizioni di salute degli animali allo scopo di evitare danni durevoli, dolore, inutili sofferenze o angoscia;
- fornire la propria assistenza veterinaria, nonché la propria consulenza sul benessere degli animali eseguendo regolari ispezioni verificando le condizioni in cui sono alloggiati e curati gli animali, in base alle necessità sperimentali;
- controllare la buona esecuzione delle procedure di esperimento, al termine delle quali dovrà decidere se l'animale debba essere mantenuto in vita o soppresso, nell'eventualità che permangano dolore e sofferenza dell'animale.
- provvedere alla verifica generale del protocollo di sperimentazione, sottoscrivendolo per quanto di competenza, monitorando le procedure dalla ideazione alla realizzazione e loro conclusione.
- nell'eventualità in cui pervengano richieste di adozione da parte di associazioni animaliste o privati, sempre che le condizioni degli animali lo permettano, valutarne la possibilità e autorizzarne l'affidamento.

- nella valutazione globale, essere in grado di poter fornire considerazioni etiche sull'uso degli animali in un determinato progetto, e assicurare l'applicazione del principio delle 3R di Russell e Burch, che costituiscono l'elemento essenziale per l'autorizzazione.

Perché sia possibile quanto finora elencato e affinché venga garantito un uso eticamente corretto degli animali impiegati nella ricerca, si rendono necessarie da parte del veterinario una competenza e una professionalità che solo una adeguata formazione è in grado di dare.

A tale proposito la nuova Direttiva 63/2010, tra le varie normative, per la prima volta a livello comunitario, impone la formazione continua e il controllo della competenza degli operatori coinvolti a vario titolo nella sperimentazione animale, individuando le figure responsabili di assicurare tali requisiti.

Non essendoci al momento, indicazioni dettagliate in merito, si può fare riferimento a quanto riferito dalla *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) che ha identificato quattro categorie professionali, per ognuna delle quali è previsto un corso di formazione specifico:

Categoria A: addetti all'*animal care*

Categoria B: personale tecnico addetto alla sperimentazione

Categoria C: ricercatori responsabili del progetto e della conduzione dell'esperimento

Categoria D: esperti in scienza degli animali da laboratorio.

Responsabile dello stabulario

Deve essere persona qualificata e competente e possedere una adeguata conoscenza delle specie animali stabulate nell'impianto e delle necessità derivanti dai protocolli delle ricerche che vengono svolte nella Struttura. Cura aspetti organizzativi e sanitari.

Al *Responsabile dello stabulario* attualmente compete di:

- Rispondere della corretta programmazione e gestione dello stabulario e dell'assolvimento dei compiti organizzativi e tecnici.
- Promuovere e curare l'aggiornamento e la formazione del personale tecnico che opera nello stabulario.
- Curare la stabulazione e il trattamento degli animali, indicando quali sono le idonee condizioni ambientali, sanitarie e sociali, affinchè gli animali vengano stabulati garantendone il benessere psico-fisico.
- Vigilare su compiti del personale addetto alla sanificazione degli ambienti e alla manutenzione degli impianti, avvalendosi di adeguato personale tecnico, proponendo procedure operative standard.
- Curare il benessere e la salute degli animali, nel rispetto dei protocolli sperimentali, sotto il controllo del *Medico Veterinario* (art. 5).
- Curare l'aggiornamento dei registri, di cui ai commi 3 e 4 dell'art. 12 e di cui ai commi 1 e 2 dell'art. 11 del DL.vo 116/1992.
- Svolgere compiti di vigilanza affinché le norme connesse alla stabulazione e alla sperimentazione animale, vengano garantite.
- Compilare correttamente i registri di carico e scarico degli animali e offrire consulenza e supporto a coloro che redigono i progetti di ricerca relativamente alle modalità di comunicazione agli organi competenti preposti, (art. 7 o autorizzazione in deroga agli art. 8 e 9).
- Effettuare entro il 30 marzo di ogni anno, la relazione relativa ai dati statistici sull'utilizzo degli animali utilizzati ai fini sperimentali (art. 15 DL.vo 116/1992) da inviare al Ministero della Salute.

- Pianificare un idoneo smaltimento dei rifiuti derivanti dalla stabulazione di colonie di animali utilizzati nella ricerca.
- Vigilare sulla professionalità del Veterinario e sul corretto svolgimento della sua professione dettata dalla sua esperienza nel settore.
- Provvedere alla formazione del personale e al suo continuo aggiornamento.

Responsabile del progetto sperimentale

Il *responsabile del progetto sperimentale* è figura fondamentale per la normativa vigente.

Il Decreto Legislativo 116/1992 ha introdotto un regime di autocontrollo che fa carico a qualsiasi figura di ricercatore, persona fisica o giuridica, pubblica o privata, del rispetto di requisiti, oggettivi e soggettivi nonché limiti e condizioni, stabiliti e applicabili in tutte le fasi della procedura sperimentale.

Al di fuori di tali condizioni, ad eccezione delle deroghe che la normativa vigente prevede, si configura illecito di natura penale.

Il responsabile del progetto di ricerca deve assicurare competenza e capacità nello svolgimento delle procedure (Art. 23-63/2010), ed essere in grado di poter trasferire le proprie conoscenze a coloro che collaborano nel proprio progetto sperimentale, allo scopo di poter garantire una corretta esecuzione delle procedure da parte dei suoi collaboratori, redigere e sottoscrivere il progetto di ricerca.

Il responsabile del progetto sperimentale, ha il dovere di garantire che l'utilizzo di un animale venga attentamente valutato, considerando la validità, l'utilità e la pertinenza scientifica dei risultati attesi ed essere in grado di saper presumere il danno arrecato agli animali che dovrebbe essere valutato in relazione ai benefici attesi.

Animal-Welfare body (art. 26 2010/63)

L'Organismo preposto al benessere degli animali ha il compito di:

- consigliare il personale che si occupa del benessere animale su problemi a questo inerenti;
- dare consigli sull'applicazione del principio delle 3R;
- sollecitare gli approcci alternativi all'utilizzo degli animali;
- definire i sistemi di controllo affinché i suddetti punti vengano garantiti, seguendo sviluppo ed esito dei progetti.

Il medico veterinario dovrebbe "di diritto" far parte di questo organo per assicurare competenze tecniche specifiche.

Utile supporto per le valutazioni dell'Organismo, sarebbe un sistema di informazioni in modo tale da evitare le duplicazioni sperimentali.

I punti della nuova Direttiva di interesse veterinario

La nuova Direttiva descrive dei punti sui quali vengono sviluppati i successivi articoli.

Penso che alcuni di questi siano di pertinenza specifica del veterinario:

- ***Punto 22***
  "Per promuovere la trasparenza, facilitare l'autorizzazione dei progetti e fornire strumenti per il controllo della conformità, è opportuno introdurre una

classificazione delle procedure in funzione della gravità, basata sul livello stimato di dolore, sofferenza, angoscia o danno prolungato inflitto agli animali."
Eticamente sarebbe opportuno stimare un limite massimo di dolore, sofferenza e angoscia, oltre il quale gli animali non dovrebbero essere sottoposti.
Si presume che sia proprio il veterinario con la sua expertise, che dovrebbe essere in grado di poter porre questo limite, da lui individuabile, e di conseguenza, poter disporre di vietare lo svolgimento di procedure che potrebbero provocare dolore e sofferenza intensi, protratti e non alleviabili.
Qualsiasi veterinario responsabile del benessere degli animali utilizzati nella ricerca, dovrebbe essere oltremodo in grado di poter valutare alcuni punti, quali le procedure e le manipolazioni alle quali gli animali sono sottoposti, classificare la gravità delle procedure, poter presumere la possibile sofferenza che gli animali potrebbero provare.

- ***Punto 23***
  "Da un punto di vista etico, è opportuno fissare un limite massimo di dolore, sofferenza e angoscia per gli animali al di là del quale gli animali non dovrebbero essere soggetti nelle procedure scientifiche. A tal fine, è opportuno vietare l'effettuazione di procedure che provocano dolore, sofferenza o angoscia intensi che potrebbero protrarsi e non possono essere alleviati".

- ***Punto 24***
  "…è opportuno tenere conto dell'effettiva gravità del dolore, della sofferenza, dell'angoscia o del danno prolungato patiti dall'animale piuttosto che della gravità prevista al momento della valutazione del progetto".
  Eticamente, dovrebbe essere il medico veterinario ad avere le competenze per poter presumere ed eventualmente vietare l'effettuazione di procedure che, secondo il suo parere tecnico-scientifico potrebbero nuocere agli animali.

- ***Punto 25***
  "…ridurre il numero di animali utilizzati nelle procedure effettuando più di una volta gli esperimenti sullo stesso animale……il vantaggio del riutilizzo di animali dovrebbe essere valutato in funzione dei possibili effetti negativi sul loro benessere…….il riutilizzo di animali dovrebbe essere valutato caso per caso."
  L'impegno del Veterinario responsabile e le conoscenze richieste, prevedono per la valutazione, elevata competenza ed esperienza.

- ***Punto 26***
  "Al termine della procedura è opportuno prendere la decisione più adeguata sul futuro dell'animale tenendo conto del suo benessere e dei potenziali rischi per l'ambiente"
  Il medico veterinario ha le competenze per prendere decisioni sul futuro degli animali utilizzati al termine delle procedure. Valutare lo stato di benessere e proporre eventuale sacrificio e se del caso reinserimento.

- ***Punto 30***
  "Per garantire il monitoraggio continuo delle esigenze in tema di benessere animale, è opportuno che siano disponibili in permanenza le necessarie cure veterinarie e che all'interno di ciascuno stabilimento vi sia un membro del personale responsabile della cura e del benessere degli animali".
  Affinchè sia garantito il controllo delle colonie animali relativamente al benessere animale, è opportuno che siano permanenti le cure veterinarie necessarie. E che un membro del personale sia nominato responsabile della cura e del benessere animale.

- ***Punto 35***
  " Tra gli Stati membri esistono differenze nei requisiti in tema di sistemazione e cura degli animali, che contribuiscono alla distorsione del mercato interno. Inoltre, alcuni requisiti non rispecchiano più le ultime conoscenze sull'impatto che le condizioni di sistemazione e cura esercitano,sia sul benessere degli animali, sia sui risultati scientifici delle procedure. Nella presente Direttiva, pertanto, occorre stabilire requisiti armonizzati in materia di sistemazione e cura. Tali requisiti dovrebbero essere aggiornati sulla base dello sviluppo scientifico e tecnico".
  Il Medico veterinario responsabile, per quanto suddetto,dovrebbe essere in grado, sulla base delle più recenti conoscenze scientifiche, di poter fornire aggiornamenti atti a migliorare la cura e la salute dei modelli animali utilizzati.
- ***Punto 38***
  "La valutazione globale del progetto, tenuto conto di considerazioni etiche sull'uso degli animali, costituisce l'elemento centrale dell'autorizzazione del progetto e dovrebbe assicurare l'applicazione dei principi della sostituzione, della riduzione e del perfezionamento nei progetti stessi".
  Nella valutazione globale di un progetto, il Veterinario deve dare il suo contributo, in merito all'applicazione del principio di sostituzione, riduzione e perfezionamento, per assicurarne l'applicazione, in maniera da ottenerne l'autorizzazione da parte degli Organi preposti.

Riduzione del numero di animali utilizzati

La riduzione complessiva del numero di animali utilizzati, particolarmente trattata dalla Direttiva, dovrebbe essere guidata dall'introduzione e l'uso di metodi alternativi alla sperimentazione sugli animali nelle procedure scientifiche.

La Direttiva prevede la creazione di una rete di laboratori nazionali di riferimento che avrebbe preso parte alla convalida di metodi alternativi.

Varie iniziative di ricerca e programmi contribuiscono agli sforzi di validazione all'interno dell'UE e a livello internazionale di approcci alternativi, la partnership europea per le alternative alla sperimentazione animale (EPAA) gioca per quanto suddetto un importante ruolo.

Questo organismo svolge un importante lavoro collaborativo tra Commissione Europea, aziende europee e associazioni del settore, per condividere, sviluppare, convalidare e accettare, metodi alternativi scientificamente validi per promuovere il principio dell 3R.

Aspetti maggiormente dibattuti di interesse veterinario

Metodi di soppressione

Nella Direttiva un articolo e un allegato (art.6 - all.IV) sono interamente dedicati alle procedure eutanasiche permesse, che sono chiaramente stabilite per ogni specie sulla base delle conoscenze scientifiche attuali al fine di provocare il minor dolore, sofferenza od angoscia agli animali.

Principio della sostituzione, della riduzione e del perfezionamento

Dall'articolo 4 sono chiaramente richiamati i principi delle 3R di Russell e Burch, con il fine di assicurare metodologie o strategie di sperimentazione che siano conformi ai principi di sostituzione, riduzione e miglioramento.

Attualmente questi principi sono interamente accettati dalla comunità scientifica internazionale, ed è quindi fondamentale che nella Direttiva venga richiesta l'applicazione del principio delle 3R quindi della sostituzione, dell'affinamento delle tecniche e della riduzione del numero di animali utilizzati, con la possibilità di ricercare metodi alternativi.

Organismo preposto al benessere degli animali (*animal-welfare body*)

Per la prima volta si introduce una norma che prevede, in tutte le strutture che utilizzano animali come modelli sperimentali, l'istituzione di organismi deputati alla tutela del benessere animale al di là del ruolo strettamente di competenza del veterinario.

Classificazione della gravità delle procedure - All. VIII

Nella nuova Direttiva, rispetto alla precedente, sono individuati criteri oggettivi per la definizione della gravità delle procedure in relazione alla percezione del dolore da parte degli animali sottoposti ad esperimento. Ciò è un aspetto migliorativo che fornisce uno strumento più efficace per ridurre al minimo le condizioni di sofferenza degli animali utilizzati. Inoltre viene assicurato che ogni procedura sia valutata singolarmente prima di essere autorizzata.

Ispezioni a cura degli stati membri

Sono previste ispezioni regolari da parte delle autorità competenti degli stabilimenti allevatori, fornitori e utilizzatori per verificare la conformità con la Direttiva.

Autorizzazione dei progetti

Diversamente dalla Dir 86/609 tutti i progetti devono essere autorizzati dall'autorità competente prima dell'inizio delle procedure, dopo 45 giorni lavorativi dalla spedizione del progetto sperimentale, il responsabile della procedura potrà dare inizio ai lavori sperimentali sempreché non sia pervenuta una comunicazione del Ministero della Salute che richiede una proroga ulteriore per le opportune decisioni autorizzative.

Approcci alternativi

Nella nuova Direttiva si richiama varie volte all'impossibilità di avviare procedure sperimentali su animali vivi nel caso in cui siano riconosciuti... *altri metodi o strategie di sperimentazione per ottenere il risultato ricercato che non prevedano l'impiego di animali vivi* (Art. 13).

La necessità di sviluppare le conoscenze finalizzate al perfezionamento e l'adozione di "METODI ALTERNATIVI" per evitare il ricorso all'uso di esperimenti su animali vivi è più volte richiamata.

In sintesi, è necessario porre sempre il vincolo della ricerca di metodi alternativi applicabili, in alternativa.

Particolare attenzione è riservata alla ricerca sui metodi alternativi che si sta svolgendo all'Istituto Zooprofilattico di Brescia. La Commissione Europea e l'industria hanno istituito l'EPAA *(The European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing)* per gli approcci alternativi alla sperimentazione animale.

L'EPAA è una collaborazione senza precedenti su base volontaria tra la Commissione europea, le associazioni di categoria europee e le aziende di sette settori industriali.

I partner si impegnano a mettere in comune conoscenze e risorse per accelerare lo sviluppo, la convalida e l'accettazione di metodi alternativi per promuovere lo sviluppo di nuove metodiche in accordo con il principio delle 3R.

Requisiti formativi delle figure professionali coinvolte nella sperimentazione animale

Per la prima volta a livello comunitario si impone la formazione continua e il controllo della competenza degli operatori coinvolti a vario titolo nella sperimentazione animale individuando le figure responsabili di assicurare tali requisiti.

Ritengo sia utile che il veterinario possa mettere a disposizione la propria esperienza e contribuire personalmente alla formazione di coloro che effettuano ricerca con animali vivi, ricercatori e personale addetto alla stabulazione.

Riutilizzo degli animali

In accordo con le decisioni del veterinario, considerando le esperienze vissute dagli animali nelle procedure precedenti e affinché si possa adottare il principio della riduzione del numero di animali, questi potranno essere riutilizzati sempreché le condizioni di riutilizzo sussistano.

Vigilanza veterinaria

Viene chiaramente definita la figura del medico veterinario responsabile, esperto in medicina degli animali da laboratorio che deve essere disponibile in ogni stabilimento al fine di fornire adeguata consulenza sul benessere e il trattamento degli animali.

Il veterinario responsabile deve essere in grado di poter fornire consulenze affinchè possa essere garantito un controllo dello stato sanitario, il suo mantenimento e la valutazione di tutti i fattori che possono influenzarlo.

Gli animali dovrebbero essere trattati come creature senzienti, e il loro utilizzo nelle procedure dovrebbe essere limitato a quei casi in cui ci possa essere un reale beneficio per la salute umana, animale, o per la salvaguardia dell'ambiente.

Gli animali hanno un valore intrinseco che dovrà essere rispettato e il loro utilizzo verrà preso in considerazione esclusivamente se non esistono metodi alternativi utilizzabili.

Le procedure scelte, (intesa come procedura qualsiasi uso che possa provocare dolore sofferenza o danno, equivalente o prolungato generato dall'inserimento di un ago conformemente alle buone prassi veterinarie), dovrebbero possibilmente evitare che gli animali possano morire a causa di gravi sofferenze dovute a esse stesse.

Il veterinario e, verosimilmente, tutti coloro che entrano a far parte delle procedure sperimentali, dovrebbe essere in grado di consigliare o utilizzare metodi più umanitari e tenendo

conto dei sintomi clinici presenti, prendere in considerazione, eventualmente come esito finale, la morte umanitaria degli animali.

Ancora una volta viene sottolineata l'esigenza da parte di tutti coloro che utilizzano animali vivi ai fini sperimentali, di una formazione adeguata e una conoscenza concreta delle specie utilizzate, conoscenza della biologia della specie e delle eventuali modificazioni comportamentali, quest'ultime spesso unico indizio evidenziabile di denuncia della sofferenza degli animali oggetto delle procedure.

Ritengo con convinzione, che la figura ragionevolmente più competente per effettuare valutazioni sulle modificazioni cliniche e comportamentali degli animali utilizzati, che potrebbero presentarsi in esito alle procedure effettuate, possa essere il solo medico veterinario piuttosto che " un esperto adeguatamente qualificato".

Per una corretta analisi, il veterinario responsabile, dovrebbe effettuare una valutazione caso per caso delle singole procedure, considerando il grado di dolore, di sofferenza, di stress e di danni provocati, anche basandosi sulle esperienze nocive, vissute dagli animali nel corso delle procedure, di modo che, la idonea applicazione delle classi di gravità venga determinata da giudizi professionali e conoscenza scientifica.

Il recepimento Italiano della Direttiva 63/2010 dovrebbe ben chiarire e valorizzare la figura e i compiti del veterinario responsabile che, da parte sua, dovrà dimostrare sempre competenza e conoscenza tecnico- scientifica degli argomenti che lo riguardano per lo svolgimento dei compiti a lui affidati, nel rispetto dell'etica, attribuendo grande importanza al valore intrinseco che ogni essere animale vivente, utilizzato per scopi scientifici, possiede. La figura del medico veterinario dovrà essere un riferimento affinché venga mantenuto il rispetto e la tutela della salute e del benessere degli animali.

Bibliografia

Commissione Europea. Direttiva 86/609/CEE del Consiglio del 24 novembre 1986 concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati Membri relative alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L358:1-28.

Comunità Europea. Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L1276 del 20 ottobre 2010.

Italia. Decreto Legislativo 27 gennaio 1992 n.116. Attuazione della Direttiva n. 86/609/CEE in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale - Supplemento Ordinario* n. 40 del 18 febbraio 1992.

Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Potters Bar, UK: Universities Federation for Animal Welfare; 1959.

DIRETTIVA EUROPEA 2010/63 E IMPIEGO DEI PESCI NELLA RICERCA BIOMEDICA

Arianna Manciocco
Dipartimento di Progettazione Molecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma

Secondo l'ultimo rapporto tecnico dell'Unione Europea sul numero di animali impiegati in ambito scientifico negli Stati Membri, il 9,6% degli individui ospitati nei laboratori di ricerca è rappresentato da animali a sangue freddo quali rettili, anfibi e pesci (CE, 2010a). Per quel che riguarda i pesci, in questi ultimi anni sono aumentate le evidenze scientifiche a favore di una qualche capacità da parte di questi animali di provare dolore, sofferenza, o angoscia, prove affiancate e supportate dalle numerose somiglianze anatomiche, fisiologiche e comportamentali riscontrate tra alcune aree del cervello dei pesci e quelle dei Tetrapodi. A tali conoscenze si affianca poi la ormai scientificamente riconosciuta consapevolezza che il benessere di questi individui può essere influenzato da numerosi fattori ambientali.

Tutti questi aspetti nel loro insieme hanno spinto la Comunità Europea a occuparsi in termini legislativi di quelle che devono essere le condizioni di vita dei pesci nei laboratori di ricerca. Necessità che era già stata raccolta in ambito europeo con la Raccomandazione 2007/526 (CE, 2007). Oggi questo bisogno è stato ulteriormente ufficializzato e rafforzato con l'inserimento di un paragrafo specifico per la tutela di questi animali all'interno della nuova Direttiva sulla protezione degli animali impiegati a scopo scientifico (CE, 2010b).

I pesci come modello sperimentale

I pesci sono oggi considerati un valido modello sperimentale per studi di tossicologia, immunologia, embriologia, dermatologia (Law, 2003; Acosta *et al.*, 2005; Rademacher *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008; Rakers *et al.*, 2010), oltre a essere ampiamente utilizzati per comprendere i meccanismi di regolazione genetica in processi quali lo sviluppo, l'invecchiamento e la carcinogenesi (Amsterdam & Hopkins, 2006; Grimholt *et al*., 2009).

Caratteristiche biologiche quali un'elevata fecondità, una fecondazione esterna, uova trasparenti e un breve ciclo vitale, rendono questi animali particolamente utili come modelli animali, poichè è possibile ottenerne un gran numero in poche generazioni, oltre a essere semplice seguirne i meccanismi riproduttivi e ontogenetici

Buona parte della ricerca scientifica che impiega i pesci come modello animale è di tipo tossicologico e si basa sulle somiglianze che questi animali condividono con i mammiferi in processi quali la risposta metabolica a tossici ambientali, come i polialogenati bifenili (PCBs) o le sostanze diossina-simili (Stegeman & Hahn, 1994; Williams *et al.,* 1998). Inoltre, altro elemento importante per l'impiego di questi animali in questo tipo di studi, è lo stretto contatto che gli individui hanno con l'ambiente esterno, tramite le branchie e l'epitelio. Caratteristica questa che li rende particolarmente sensibili all'esposizione ai composti solubili.

A questo si aggiunge l'accentuata sensibilità che diverse specie mostrano a numerosi agenti di natura cancerogena, con il conseguente sviluppo di processi tumorali in tempi brevi (Bailey *et al.,* 1996; Bunton, 1996; Kazianis & Walter, 2002). A tale riguardo bisogna, comunque, sottolineare la necessità di un'attenta valutazione nella scelta della specie da impiegare, essendoci risposte specie-

specifiche ai diversi trattamenti. Ad esempio, diverse specie di pesci teleostei reagiscono ai barbiturici diversamente da quanto accade nei mammiferi (Kleinow *et al.,* 1990).

Le ricerche in ambito tossicologico che coinvolgono i pesci teleostei hanno sia un'applicazione strettamente biomedica (es. valutazione della tossicità di un farmaco) sia di tipo più strettamente eco-tossicologico, con i pesci considerati validi indicatori di rischio ambientale. Questo ultimo tipo di studi sono ben validati su pesci quali i salmonidi, mentre sono meno noti gli effetti che i contaminanti ambientali hanno su pesci di minori dimensioni, quali il pesce zebra (*Danio rerio*) e la medaka (*Oryzias latipes*) molto impiegati, invece, negli studi di biologia molecolare.

A questo ultimo riguardo, uno dei vantaggi nell'utilizzo di queste due specie è la semplicità e l'efficienza con cui si riesce a manipolare l'espressione dei geni negli embrioni. Questo permette, ad esempio, di comprendere il ruolo di numerose mutazioni nello sviluppo di molte patologie umane, quali le malattie cardiovascolari, l'osteoporosi, l'emofilia e la cura dei tumori. Pertanto, questi vertebrati possono essere una valida alternativa all'impiego dei modelli murini, rappresentando un ottimo esempio di *partial replacement*.

La semplicità del genoma di *Danio rerio*, detto anche danio zebrato, in particolare permette di svolgere procedure difficili da compiersi in altri modelli animali, quali ad esempio l'isolamento delle mutazioni e l'analisi fenotipica con conseguente individuazione della funzionalità di un gene. Questa specie, inoltre, presenta una percentuale di omologia con la maggior parte delle sequenze geniche umane compresa tra il 50% e l'80% (Ingham, 2009). A tale proposito, gli elevati livelli di omologia riscontrati tra l'essere umano e il danio zebrato nelle sequenze di alcuni geni coinvolti nello sviluppo di patologie tumorali, favorisce l'impiego di questi modelli animali per lo studio dei meccanismi che regolano la cancerogenesi (Talbot & Hopkins, 2000).

In questi ultimi anni, inoltre, il pesce zebra è sempre più presente nei laboratori di ricerca per lo studio dei meccanismi molecolari coinvolti nell'insorgenza di diverse malattie neurodegenerative (Best & Alderton, 2008; Flinn *et al*. 2008; Diekmann *et al.,* 2009; Abashi *et al.,* 2011). L'impiego di questi pesci nelle ricerche sulla malattia di Alzheimer, ad esempio, si basa sull'osservazione che mutazioni genetiche responsabile della formazione delle placche beta-amieloidi nell'essere umano, quando indotte in esemplari di *Danio rerio*, sono, così come nell'uomo, associate a una secrezione anormale della proteina beta-amieloide. Inoltre, recenti studi svolti su esemplari di danio zebrato transgenici hanno messo in evidenza un coinvolgimento della proteina *tau,* implicata nella comparsa di sintomi di demenza nell'uomo, nella presenza di fenomeni cellulari anomali (Paquet *et al.,* 2009).

Sempre nell'ambito delle malattie neurodegenerative, il pesce zebra rappresenta anche un buon modello per lo studio dei meccanismi molecolari che caratterizzano la malattia di Parkinson. Infatti, numerosi sono i geni presenti in questa specie e coinvolti nell'insorgenza della malattia (es. DJ-1, UCH-L1) (Son *et al*., 2003; Bretaud *et al*., 2007). Inoltre, il trattamento con la neurotossina 1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidro-piridina (MPTP) è stato visto determinare negli embrioni di pesce zebra una perdita di neuroni dopaminergici (Bretaud *et al*., 2004; Lam *et al*., 2005), simulando quindi quanto avviene nei più comunemente utilizzati modelli murini. Inoltre, numerose aspettative sono riposte nell'utilità che *Danio rerio* potrà avere nei prossimi anni per comprendere meccanismi della comparsa delle patologie del sistema nervoso centrale, quali l'epilessia (Baraban *et al.,* 2007; Tiedeken *et al.,* 2007).

Infine, l'organizzazione e le caratteristiche del genoma dei pesci teleostei risultano particolarmente adatti per studi di natura evolutiva e quindi utili alla ricerca di base. Questi vertebrati hanno avuto una storia evolutiva lunga e complessa, che ha portato a numerose differenze nell'organizzazione genomica e nel cariotipo tra i diversi gruppi di pesci. Infatti, anche se la maggior parte di questi animali ha cromosomi di dimensioni medio-piccole e

presenti in doppia copia, numerose sono le differenze. Ad esempio, il cariotipo degli storioni presenta alcune caratteristiche peculiari, quali un'elevato numero di cromosomi ed eventi di poliploidizzazione che hanno contraddistinto la loro diversificazione specifica (Amores *et al.,* 1998). Al contrario, la perdita su larga scala di geni duplicati, così come sequenze non codificanti, ha portato a un genoma compatto e particolarmente piccolo nei pesci appartenenti alla famiglia dei Tetraodontidi (Jallian *et al.,* 2004). Inoltre, grandi genomi sono stati trovati in famiglie come quella dei salmonidi, i quali sembrano essere stati sottoposti a una seconda più recente duplicazione del genoma, che ha anche portato anche alla tetraploidia in queste specie (Allendorf & Thorgaard, 1984). Partendo da queste differenze indagini, condotte con tecniche di citogenetica convenzionale e molecolare, permettono di formulare alcune ipotesi sui rapporti filogenetici tra le diverse specie.

Perché occuparsi del benessere dei pesci

Se si pensa che, attualmente, gli impianti che non ospitano almeno una colonia di pesci zebra (*Danio rerio*) o di medaka (*Oryzias latipes*) non vengono considerati all'avanguardia nella ricerca scientifica, si comprende come mai in questi ultimi anni sempre più fervente è il dibattito sulla necessità di occuparsi del loro benessere (Braithwaite & Huntingford, 2004; Broom, 2007; Iwama, 2007).

Molto diffuso oggi è il concetto secondo il quale la capacità di provare sensazioni quali il dolore, la paura o la sofferenza, unita alla capacità di avere una qualche funzione cognitiva, sono considerate caratteristiche necessarie affinché si possa assegnare a un animale uno *status* di essere senziente e con esso avere l'obbligo morale di occuparsi del suo stato di benessere (Duncan, 1996; Fraser, 1997; Broom, 2007). Questo tipo di visione, tipica di un approccio antropomorfico al mondo naturale, rischia di far sì che, come risultato finale, le nostre attenzioni vengano limitate a un numero piuttosto ristretto di animali.

Seguendo questo ragionamento, alcuni autori individuano nella mancanza di neocorteccia nei pesci l'indicazione inequivocabile dell'impossibilità per questi animali di provare sensazioni complesse o di avere determinate capacità cognitive (per dettagli vedere Rose, 2007).

Questo approccio ha origine dal fatto che la neocorteccia, che nell'essere umano rappresenta il 90% della superficie cerebrale, è considerata la sede preposta nei mammiferi a funzioni superiori, quali la possibilità di provare sofferenza, paura, oltre a essere la sede di funzioni quali l'apprendimento e la memoria. In realtà, è importante notare che sebbene i pesci non presentino un *pallium* laminato, tuttavia questa struttura risulta essere altamente differenziata per quel che concerne il processamento delle informazioni sensoriali (Prechtl *et al.,* 1998), visive (Saidel *et al.,* 2001), olfattorie (Laberge & Hara, 2001) e acustiche (Goodson & Bass, 2002).

A queste evidenze scientifiche bisogna aggiungere l'osservazione che a tenere in considerazione solo l'anatomia cerebrale di una specie si rischia di incorrere in un grave errore, poiché gli animali tra di loro differiscono nelle parti del cervello preposte a funzioni complesse e quindi le funzioni relative a provare dolore o piacere possono essere assolte da alcune strutture in alcune specie e da altre in animali differenti. Ad esempio sebbene in numerosi mammiferi la sede delle più elevate funzioni cerebrali sia la corteccia, una comparabile elevata complessità funzionale è ritrovabile in alcune aree dello striato degli uccelli, oltre che in una varietà di regioni cerebrali nei pesci e nei cefalopodi (Barton & Dunbar, 1997; Broglio, 2003).

Inoltre, la percezione sensoriale legata al senso della vista e la regione del cervello preposta a tale funzione, potrebbero essere sopravalutate, non prendendo in considerazione che in molti altri mammiferi, in molti pesci e invertebrati, altri sensi hanno, invece, un ruolo primario. Nel caso dei pesci, infatti, la percezione del mondo è per lo più data dall'organo della linea laterale,

costituito da un insieme di recettori sensibili alle variazioni di pressione dovute al movimento dei corpi in acqua, e che forniscono all'animale importanti informazioni sull'ambiente esterno, quali ad esempio la presenza di ostacoli fisici, predatori, nonché indicazioni sulla propria posizione all'interno del banco. Pertanto, nel tentativo di valutare la capacità che un animale ha di percepire stati di dolore o paura, e quindi occuparsi del suo benessere, bisogna innanzitutto prendere in considerazione il modo in cui il soggetto percepisce quello che è intorno a lui.

Inoltre, nella valutazione se una specie dovrebbe essere o meno elegibile di tutela da parte nostra, la prospettiva ecologica dovrebbe essere tenuta in opportuna considerazione. Infatti, la lunga e complessa storia evolutiva dei pesci teleostei, risultante in differenti adattamenti anatomici, fisiologici e comportamentali, come anche in sofisticate specializzazioni nelle strategie di foraggiamento, di riproduzione, anti-predatorie e di comunicazione (Long, 1995; Helfamn, 1997), è testimonianza di necessità biologiche complesse che, se non rispettate, possono determinare condizioni di malessere negli animali. Pertanto, indipendentemente dalle loro più o meno sviluppate capacità cognitive, animali con tali caratteristiche ecologiche dovrebbero probabilmente essere tutelati.

In generale, si possono individuare un insieme di aspetti da tenere in considerazione nel valutare l'opportunità o meno di interessarci delle condizioni di vita di una specie animale. Alcune di questi sono la complessità biologica del ciclo vitale e del comportamento, la funzionalità del cervello e del sistema nervoso, la capacità di apprendere, l'esistenza di evidenze scientifiche che indichino le basi biologiche per dimostrare la capacità di provare dolore, paura e ansia.

Per quel che riguarda la funzionalità del cervello e del sistema nervoso, l'ipotalamo dei pesci, che è ben studiato sia nella sua anatomia che nella sua funzionalità (Munro & Dodd, 1983; Sumpter, 1997), è, così come in altri vertebrati, coinvolto nell'espressione del comportamento sessuale, sociale e nell'esibizione dell'aggressività (Fox *et al.,* 1997; Folgueira *et al.,* 2002; Portavella *et al.,* 2002). Inoltre, i pesci rispondono in modo simile a quanto osservato nei mammiferi per quel che riguarda la risposta ad agonisti dopaminergici quali anfetamine e apomorfine, facendo supporre un'innervazione dopaminergica comparabile (Pollard *et al.,* 1996; Mok & Munro, 1998). A questo si aggiunge che in questi animali esiste un complesso dell'amigdala, la cui stimolazione elettrica o il danneggiamento portano a cambiamenti nei livelli di aggressività simili a quelli osservati in seguito trattamenti analoghi nei mammiferi (Portavella *et al.,* 2002).

Anche in assenza di neocorteccia, le capacità di apprendimento e memoria dei pesci sono ampiamente dimostrate (Kieffer & Colgan, 1992; Topal & Csanyi, 1999; Doutrelant & McGregor, 2000; Brown & Laland, 2001; McGregor *et al.,* 2001; Brown, 2003; Kelley & Magurran, 2003; Atton, 2010). I pesci sembrano avere un corrispettivo del sistema limbico dei mammiferi nel telencefalo, la cui lesione o rimozione porta a deficit nelle capacità di orientamento spaziale e di apprendimento (Ohnishi, 1997; Lopez *et al.,* 2000; Vargas *et al*., 2000).

Questi animali sono capaci di estrapolare informazioni dall'ambiente esterno a partire da precedenti esperienze e usarle per modificare il loro comportamento in modo flessibile e adattativo. Ad esempio esemplari maschi di *Betta splendens* che assistono a scontri agonistici tra altri individui, quando posti successivamente in interazione con questi, saranno più o meno motivati a ingaggiare uno scontro sia sulla base del livello di aggressività mostrato precedentemente dal soggetto sia del risultato finale del confronto osservato (cioè a seconda che l'animale di fronte sia il perdente o il vincitore dell'interazione precedente) (Oliveira *et al.,* 1998; McGregor *et al.,* 2001).Tale capacità implica non solo l'abilità di compiere delle associazioni e di riconoscere individualmente i soggetti, ma anche di costruire delle

rappresentazioni mentali della realtà quando posti di fronte a stimoli specifici (che replicano l'esperienza precedentemente vissuta).

Anche altre specie di pesci, come la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e il salmone dell'Atlantico (*Salmo salar*) presentano l'abilità di modificare il proprio comportamento attraverso l'osservazione di altri pesci, sia in contesti sociali che di foraggiamento (Johnsson & Akerman, 1998; O'Connor *et al.,* 1999). Questi animali mostrano quindi una capacità di apprendimento attraverso l'osservazione e non, per esempio, mediante una modalità di prova ed errore.

Per quanto riguarda la capacità di provare sensazioni quali il dolore, ricerche con un approccio più neuroanatomico hanno mostrato che i pesci teleostei posseggono lo stesso tipo di fibre nervose che negli altri vertebrati sono coinvolte nella sensazione del dolore (Puzdrowski, 1988; Sneddon, 2002; Sneddon *et al.,* 2003). Inoltre, studi biochimici hanno messo in evidenza l'esistenza nell'area cerebrale di alcuni pesci di un peptide analogo alla sostanza P presente nei mammiferi e responsabile della trasmissione e modulazione del segnale di dolore (Weld & maler, 1992; Commons & Valentino, 2002).

La capacità di provare il dolore, ma anche sensazioni quali la paura, sono riconosciute come un risultato adattativo della selezione naturale, che ha un fondamentale ruolo nel determinare l'espressione di specifici comportamenti che potranno, ad esempio, determinare la morte o sopravvivenza di un animale (Fraser & Duncan, 1998). Pertanto, la capacità di provare queste sensazioni può essere investigata anche studiando il comportamento degli animali.

I pesci, ad esempio, presentano risposte di fuga in presenza di stimoli prevedibilmente dolorosi, oltre a mostrare evitamento della situazione e del contesto dove la sensazione avversa è stata vissuta, anche quando l'esperienza negativa è fissata lontana nel tempo (Overli *et al.,* 1998; Topal & Csanyi, 1999).

Oltre alla sensazione fisica del dolore, i pesci sembrano anche rispondere alle situazioni che innescano lo stato emotivo di paura. Questa sensazione è caratterizzata da eventi quali la risposta branchiale e reazioni avversive di fuga (Hall & Suboski, 1995; Wisenden & Smith, 1998; Eaton *et al.,* 2001; Maren, 2001). Ad esempio, come nei mammiferi, condizioni di stress determinano una risposta adrenergica con rilascio di adrenalina e noradrenalina nel circolo sanguigno, oltre a un'attivazione del corrispondente asse ipotalamo-ipofisi-surrene con, in ultimo, l'aumento dei livelli di cortisolo nel sangue (Sumpter, 1997; Wendelaar Bonga, 1997). Inoltre, questi animali non rispondono bene a prolungati periodi di stress presentando anche un abbassamento dell'efficienza del sistema immunitario, diventando più vulnerabili alle malattie (Wedemeyer *et al.,* 1990; Barton & Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997).

Gli studi riportati mostrano che i pesci ricordano, riconoscono e interpretano quanto accade loro intorno, esibendo quindi dei tratti comportamentali che possono essere considerati il punto di partenza per una seppur elementare forma di coscienza e cognizione consapevole. La percezione che i pesci hanno dello stress e il ricordo di tale sensazione fa riflettere sulla necessità di considerare, accanto agli aspetti anatomici, fisiologici e neuronali di tale condizione, anche quelli psicologici.

L'intervento di un aspetto più strettamente psicologico nella risposta a una condizione avversa da parte dei pesci, è supportato da studi in cui si condizionavano gli animali a eventi quali shock termici o elettrici, e in seguito ai quali si osservava una riduzione dell'incremento del livello di cortisolo (Schreck *et al.,* 1995). In altre ricerche, inoltre, si è visto che la condizione di stress cronico vissuta da individui subordinati di specie con forti gerarchie sociali (es. la trota iridea) era maggiormente dovuta alla presenza del soggetto dominante, più che da sue esibizione di minaccia vere e proprie (Winberg & Lepage, 1998).

In conclusione quindi appare chiaro che le numerose somiglianze anatomiche, biochimiche e neurocomportamentali, che i pesci hanno con animali comunemente considerati più vicini a noi

quali i mammiferi, unite alla complessità ecologica di questi animali, non solo giustificano, ma hanno reso quanto mai necessario l'elaborazione di normative e linee guida specifiche per questo gruppo di vertebrati.

Legislazione europea

Nell'appendice III (*Annex III*) della Direttiva europea 2010/63 vengono indicate le caratteristiche che devono avere i locali che ospitano gli animali e le modalità con cui questi devono essere trattati. Questa parte della legislazione è organizzata in una sezione generale (Section A) che riporta tutti quegli aspetti generici di carattere fisico e tecnico che riguardano le stanze di stabulazione e le procedure di trattamento degli animali (es. trasporto, manipolazione), validi per ogni specie animale. C'è, poi, una seconda sezione (*Section B*) che invece tratta le necessità specie-specifiche.

In questa seconda parte è presente un paragrafo dedicato ai pesci, nel quale vengono considerati sia aspetti riguardanti l'ambiente in cui essi sono mantenuti, sia le modalità di mantenimento di questi animali. Sono presenti sotto-paragrafi in cui vengono fonite note tecniche dettagliate e che tengono conto della variabilità specie-specifiche interna a questo gruppo di vertebrati.

Secondo quanto riportato dalla Direttiva, la qualità dell'acqua nelle vasche è il primo aspetto da considerare in una prospettiva di benessere animale. Infatti, lo stretto contatto che questi animali hanno con l'elemento liquido, innanzitutto tramite le branchie e l'epitelio, li rende fortmente sensibili alle caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua. Pertanto, secondo la nuova legislazione, acqua di opportuna qualità deve essere sempre presente negli acquari.

In particolare, la concetrazione di ossigeno dovrà essere appropriata alle necessità specie-specifiche e al contesto in cui gli individui sono tenuti. A tal fine, bisognerà provvedere, se necessario, a un sistema di aereazione supplementare. La concentrazione di ossigeno, infatti, è stata vista influenzare il metabolismo (Lefrancois & Claireaux, 2003), l'attività di nuoto (Steffensen & Farrell, 1998; Fitzgibbon, 2007), i tassi di crescita e di sopravvivenza degli animali (Smith & Able, 2003). Inoltre, il livello di ossigeno richiesto dipende dagli adattamenti ecologici sviluppati per rispondere alle condizioni di ipossia.

Il livello dei nitrati e nitriti dovrà costantemente essere monitorato, affinchè questi ultimi siano mantenuti a basse concentrazioni. In condizioni di cattività, infatti, la concentrazioni di nitriti e di ammoniaca in vasca rappresentano uno tra i principali, se non il principale, motivo di mortalità dei soggetti. Questi composti derivano dalla materia organica rilasciata in acqua, quali cibo e feci, come anche dall'urea disciolta.

Il livello di pH deve essere tentuo il più possibile stabile e dovrà essere scelto in base alle necessità biologiche delle singole specie.

Inoltre, deve essere prestata attenzione alla salinità rispetto alle tolleranze specie-specifiche per la variazione di questo parametro, e in base alla fase di sviluppo in cui si trovano i soggetti. Anche nel caso di specie eurialine, che tollerano cioè ampi intervalli di salinità, devono essere svolti cambiamenti graduali di questi parametri.

I corretti valori di tutti questi parametri chimico-fisici dovranno essere garantiti fornendo gli acquari di opportuni sistemi di circolazione e di filtrazione dell'acqua. Inoltre, bisognerà attivamente provvedere alla rimozione dalle vasche di qualsiasi sostanza (es. feci) che possa contribuire a deteriorare la qualità dell'acqua.

La Direttiva specifica che i valori dei parametri sopra considerati dovranno essere conservati all'interno di intervalli che garantiscano la normale attività e i normali processi fisiologici tipici di ogni specie e di ogni fase ontogenetica. Il riferimento, anche se indiretto, al comportamento e

l'attenzione alle diverse fasi di sviluppo rappresenta una notevole passo avanti per un documento ufficiale di così ampia applicazione.

La temperatura dell'acqua rappresenta un fattore di notevole importanza non solo per il benessere dei pesci, ma anche per la sopravvivenza degli animali, oltre a influenzare processi biologici quali il differenziamento sessuale e la crescita. I pesci hanno, infatti, una temperatura corporea uguale a quella ambientale, pertanto il mantenimento di un valore costante per questo parametro è un aspetto particolarmente rilevante per il loro benessere. Inoltre, questo parametro influenza il tasso metabolico e quello di conversione alimentare (Stoner, 2004), la morfologia (Sfakianakis *et al.,* 2006), nonchè diversi comportamenti (Claireaux *et al.,* 2006; Varsamos *et al.,* 2006). Alla luce di questo, la Direttiva sottolinea la necessità di garantire un intervallo di temperatura adeguato per le necessità della specie ospitata, e soprattutto condurre dei cambi di acqua graduali.

Nel paragrafo dedicato ai pesci, sono, inoltre, presenti indicazioni volte a definire le caratteristiche che devono avere le stanze in cui gli animali sono stabulati. Come la temperatura, anche la luce rappresenta un elemento di cruciale importanza per molti processi biologici, pertanto particolare cura deve essere prestata a questo aspetto.

I pesci devono essere tenuti con un fotoperiodo adeguato alle esigenze della specie e della fase ontogenetica in cui essa si trova. Inoltre, il rumore rappresenta un potenziale elemento di notevole disturbo per questi animali, visto l'elevato grado con cui si diffonde e amplifica nell'acqua. La rumorosità deve pertanto essere ridotta al minimo, e nessuno strumento che produce rumore (compresi i sistemi di filtrazione dell'acqua, che dovranno essere opportunamente isolati) dovrà essere mantenuto in prossimità delle vasche.

Il benessere dei pesci è poi influenzato da un insieme di aspetti che riguardano le modalità di mantenimento. La densità è riconosciuta essere un fattore di grande impatto sul comportamento e fisiologia di questi animali. I tassi di crescita, il rapporto tra i sessi, le modalità di foraggiamento e i livelli di aggressività, sono tutti elementi dipendenti dalla densità presente in vasca. Pertanto, la Direttiva specifica che la densità del gruppo di animali in ogni vasca deve rispettare le necessità dei soggetti al fine di garantirne delle condizioni ambientali che ne permettano il benessere e il mantenimento di un buono stato di salute. In particolare, a ogni singolo animale deve essere garantito spazio sufficiente per esibire una normale attività di nuoto, che tenga conto non solo dell'età e della dimensione, ma anche della strategia di foraggiamento. Ad esempio, specie che tendono a nutrirsi sul fondo o, viceversa, in corrispondenza della superficie dell'acqua, dovranno avere la possibilità di raggiungere senza difficoltà questa zone dell'acquario.

È poi presente un riferimento specifico agli arricchimenti ambientali, pensati per fornire agli individui la possibilità di nascondersi dalla vista dei conspecifici quand'anche degli esseri umani. Comunque, la Direttiva, anche in questo passaggio, specifica la necessità sempre di tenere conto delle caratteristiche delle singole specie nella scelta degli arricchimenti da introdurre.

Infine, vengono fornite indicazioni sulle procedure da adottare per l'alimentazione dei pesci e per la loro manipolazione. La frequenza con cui fornire il cibo e la sua quantità devono tenere conto delle caratteristiche degli individui, particolare attenzione deve esserci per le larve durante il passaggio dalla dieta rappresentata da animali vivi a quella artificiale.

Quanto riportato nella Direttiva 2010/63/UE in termini obbligatori va ad aggiungersi a quanto indicato nella Raccomandazione 2007/526/CE. Infatti, in questo documento si fornivano delle indicazioni sulle modalità di stabulazione e cura dei pesci, attraverso suggerimenti sulle caratteristiche dell'ambiente in cui ospitare gli animali, sulle procedure per monitorare la loro salute, sulle modalità di manipolazione.

Conclusioni

Come detto, le capacità cognitive dei pesci, la somiglianza anatomica e fisiologica di molte loro strutture nervose con quelle dei Tetrapodi, rendono oggi giorno quanto mai acceso il dibattito sull'assegnazione a questi animali dello *status* di esseri senzienti. Inoltre, aspetti quali la storia naturale di questi vertebrati e la complessità del loro comportamento sono caratteristiche che mostrano come queste specie abbiano numerose necessità biologiche di base, la cui non soddisfazione può determinare condizioni di stress in questi animali.

Alla luce di queste valutazioni, l'inserimento nella Direttiva 2010/63 di un paragrafo che si occupi in modo specifico dei pesci, al fine di tutelare il loro impiego nella sperimentazione scientifica e garantirne il benessere, certamente rappresenta un importante passo in avanti nell'ambito della legislazione europea e una testimonianza del crescente sentire comune in tal senso.

Inoltre, i vari riferimenti all'esigenza di tenere conto e rispettare la specie-specificità delle necessità biologiche, può essere interpretata come la volontà di tenere conto dei sempre crescenti studi che mettono in evidenza gli aspetti peculiari di ogni specie.

Allo stesso tempo però, le evidenze scientifiche che sottolineano la capacità che questi animali hanno di "sentire" l'ambiente circostante, unita alle difficoltà incontrate e ai tempi lunghi che sono stati necessari per la revisione della vecchia Direttiva 86/609, portano a un rammarico per il complessivamente ridotto spazio che è stato dedicato a questi animali.

L'assenza, inoltre, di note sulla necessità di standardizzare le procedure di stabulazione rappresenta una mancanza degna di nota. Infatti, l'ambiente acquatico ha caratteristiche uniche ed estremamente peculiari, che rendono il mantenimento di una condizione di stabilità un compito piuttosto arduo. Le difficoltà non risiedono solo nel preservare situazioni stabili e analoghe tra vasche per tutta la durata di un procedimento sperimentale, ma anche nell'individuare opportuni metodi di indagine di tale condizione di stabilità. Pertanto, quanto mai necessario sarebbe stato fornire indicazioni sui metodi da adottare per monitorare le condizioni ambientali, così come di salute degli animali. Infatti, un limite dell'impiego dei pesci come modelli *in vivo* è l'assenza ad oggi di procedure standardizzate per la valutazione del loro stato di salute. Alla luce di questo, si rendeva importante in sede legislativa trattare queste problematiche e sottolineare agli Stati Membri la necessità di scambiarsi informazioni al riguardo in un'ottica di armonizzazione delle procedure.

Bibliografia

Acosta F, Petrie A, Lockhart K, Lorenzen N, Ellis AE. Kinetics of Mx expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) parr in response to VHS-DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol* 2005;18:81-9.

Allendorf F, Thorgaard G. Tetraploidy and evolution of salmonid species. In: T BJ (Ed.). *Evolutionary genetics of Fishes*. New York: Plenum Publishing Corp; 1984. p. 1-53.

Amores A, Force A, Yan YL, Joly L, Amemiya C, Fritz A, *et al.* Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science* 1998;282:1711-4.

Amsterdam A, Hopkins N. Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. *Trends Genet* 2006;22:473-8.

Bailey GS, Williams DE, Hendricks JD. Fish models for environmental carcinogenesis: the rainbow trout. *Environ Health Perspect* 1996;104(Suppl 1):5-21.

Baraban SC, Dinday MT, Castro PA, Chege S, Guyenet S, Taylor MR. A large-scale mutagenesis screen to identify seizure-resistant zebrafish. *Epilepsia* 2007;48:1151-7.

Barton B, Iwama GK. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the responses and effects of corticosteroids. *Annual Review on Fish Diseases* 1991;1:3-26.

Barton R, Dunbar R. Evolution of the social brain. In: Whiten A, Byrne R, (Ed.). *Machiavellian intelligence II.* Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1997. p. 240-63.

Best JD, Alderton WK. Zebrafish: An *in vivo* model for the study of neurological diseases. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2008;4:567-76.

Bradford Jr. M. Comparative aspects of forebrain organization in the ray-finned fishes: touchstones or not? *Brain, Behaviour and Evolution* 1995;46:259-74.

Braithwaite VA, Huntingford FA. Fish and welfare: do fish have the capacity for pain perception and suffering? *Animal Welfare* 2004;13:S87-S92.

Bretaud S, Allen C, Ingham PW, Bandmann O. p53-dependent neuronal cell death in a DJ-1-deficient zebrafish model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2007;100:1626-35.

Bretaud S, Lee S, Guo S. Sensitivity of zebrafish to environmental toxins implicated in Parkinson's disease. *Neurotoxicol Teratol* 2004;26:857-64.

Broglio C, Rodriguez F, Salas C. Spatial cognition and its neural basis in teleost fishes. *Fish and Fisheries* 2003;4:247-55.

Broom DM. Cognitive ability and sentience: which aquatic animals should be protected? *Dis Aquat Organ* 2007;75:99-108.

Brown C, Laland K. Social learning and life skills training for hatchery reared fish. *Journal of Fish Biology* 2001;59:471-93.

Brown G. Learning about danger: chemical alarm cues and local risk assessment in prey fishes. *Fish and Fisheries* 2003;4:227-34.

Bunton TE. Experimental chemical carcinogenesis in fish. Toxicol Pathol 1996;24:603-18.

Chen YH, Huang YH, Wen CC, Wang YH, Chen WL, Chen LC, Tsay HJ. Movement disorder and neuromuscular change in zebrafish embryos after exposure to caffeine. *Neurotoxicol Teratol* 2008;30:440-7.

Commons KG, Valentino RJ. Cellular basis for the effects of substance P in the periaqueductal gray and dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol* 2002;447:82-97.

Comunità Europea. Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 276/33 del 20 ottobre 2010.

Comunità Europea. Raccomandazione della Commissione del 18 giugno 2007 relativa a linee guida per la sistemazione e la tutela degli animali impiegati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L197 del 30 luglio 2007.

Comunità Europea. Report from the Commission to the Council and the European Parliament. Sixth Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in the Member States of the European Union SEC(2010) 1107. Bruxelles, 8 dicembre 2010. Disponibile all'indirizzo: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/reports_en.htm; ultima consultazione 9/2/2012.

Diekmann H, Anichtchik O, Fleming A, Futter M, Goldsmith P, Roach A, Rubinsztein DC. Decreased BDNF levels are a major contributor to the embryonic phenotype of huntingtin knockdown zebrafish. *J Neurosci* 2009;29:1343-9.

Doutrelant C, Mcgregor P. Eavesdropping and mate choice in female Fighting fish. *Behaviour* 2000;137:1655-69.

Duncan I. Animal welfare defined in terms of feelings. *Acta Agricultural of Scandinavia A* 1996;Suppl 27:29-35.

Eaton RC, Lee RK, Foreman MB. The Mauthner cell and other identified neurons of the brainstem escape network of fish. *Prog Neurobiol* 2001;63:467-85.

Fitzgibbon Q. Metabolic scope, swimming performance and the effects of hypoxia in the mulloway, Argyrosomus japonica. *Aquaculture* 2007;270:358-68.

Flinn L, Bretaud S, Lo C, Ingham PW, Bandmann O. Zebrafish as a new animal model for movement disorders. *J Neurochem* 2008;106:1991-7.

Folgueira M, Huesa G, Anadon R, Yanez J. The nucleus subglomerulosus of the trout hypothalamus is a link between chemosensory and visual systems: a DiI study. *Brain Res Bull* 2002;57:427-30.

Fox HE, White SA, Kao MH, Fernald RD. Stress and dominance in a social fish. J Neurosci 1997;17:6463-9,Fraser D, Duncan I. "Pleasure", "pains" and animal welfare: toward a natural history of affect. *Animal Welfare* 1998;7:383-96.

Goodson JL, Bass AH. Vocal-acoustic circuitry and descending vocal pathways in teleost fish: convergence with terrestrial vertebrates reveals conserved traits. *J Comp Neurol* 2002;448:298-322.

Grimholt U, Johansen R, Smith AJ. A review of the need and possible uses for genetically standardized Atlantic salmon (Salmo salar) in research. *Lab Anim* 2009;43:121-6.

Hahn ME, Stegeman JJ. Regulation of cytochrome P4501A1 in teleosts: sustained induction of CYP1A1 mRNA, protein, and catalytic activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in the marine fish Stenotomus chrysops. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994;127:187-98.

Hall D, Suboski D. Visual and Olfactory Stimuli in Learned Release of Alarm Reactions by Zebra Danio Fish (Brachydanio rerio). *Neurobiology of learning and memory* 1995;63:229-40.

Helfman G, Collette B, Facey D. *The Diversity of Fishes*. Oxford, UK: Blackwell Science; 1997.

Ingham PW. The power of the zebrafish for disease analysis. *Hum Mol Genet* 2009;18:R107-12.

Iwama GK. The welfare of fish. *Dis Aquat Organ* 2007;75:155-8.

Jallion O, Aury J, Brunet F, Petit J, Strange-Thormann N, Mauceli E, Bouneau L, Fischer C, Ozouf-Costaz A, Bernot A, Nicaud S. Genome duplication in the teleost fish Tetraodon nigroviridis reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* 2004;431:946-57.

Johnsson J, Akerman A. Watch and learn: preview of the fighting ability of opponents alter contest behaviour in rainbow trout. *Animal Behaviour* 1998;56:771-76.

Ju Z, Wells MC, Heater SJ, Walter RB. Multiple tissue gene expression analyses in Japanese medaka (Oryzias latipes) exposed to hypoxia. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2007;145:134-44.

Kabashi E, Brustein E, Champagne N, Drapeau P. Zebrafish models for the functional genomics of neurogenetic disorders. *Biochim Biophys Acta* 1812:335-45.

Kazianis S, Walter RB. Use of platyfishes and swordtails in biological research. *Lab Anim (NY)* 2002;31:46-52.

Kelley J, Magurran A. Learned predator recognition and antipredator responses in fishes. *Fish and Fisheries* 2003;4:216-26.

Kieffer J, Colgan P. The role of learning in fish behaviour. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 1992;2:125-43.

Kleinow KM, Haasch ML, Williams DE, Lech JJ. A comparison of hepatic P450 induction in rat and trout (Oncorhynchus mykiss): delineation of the site of resistance of fish to phenobarbital-type inducers. *Comp Biochem Physiol C* 1990;96:259-70.

Lam CS, Korzh V, Strahle U. Zebrafish embryos are susceptible to the dopaminergic neurotoxin MPTP. *Eur J Neurosci* 2005;21:1758-62.

Law JM. Issues related to the use of fish models in toxicologic pathology: session introduction. *Toxicol Pathol* 2003;31 Suppl:49-52.

LeDoux J. Emotion circuits in the brain. Annnual Review in Neuroscience 2000;23:155-84,Lefrancois C, Claireaux G. Influence of ambient oxygenation and temperature on metabolic scope and scope for heart rate of sole (Solea solea). *Marine Ecology Progress Series* 2003;259:273-84.

Long J. *The rise of fishes*. Baltimore, MD: John Hopkins University Press; 1995.

Lopez JC, Bingman VP, Rodriguez F, Gomez Y, Salas C. Dissociation of place and cue learning by telencephalic ablation in goldfish. *Behav Neurosci* 2000;114:687-99.

Maren S. Neurobiology of pavlovian fear conditioning. *Annual Review in Neuroscience* 2001;24:897-931.

Mcgregor P, Peak T, Lampe H. Fighting fish Betta splendens extract relative information from apparent interactions: what happens when what you see is not what you get. *Animal Behaviour* 2001;62:1059-65.

Mok EY, Munro AD. Effects of dopaminergic drugs on locomotor activity in teleost fish of the genus Oreochromis (Cichlidae): involvement of the telencephalon. *Physiol Behav* 1998;64:227-34

Munro A, Dodd J. Forebrain of fishes: neuroendocrine control mechanisms. In: Nisticò G, Bolis L, (Ed.). *Progress in Nonmammalian Brain Research, vol III.* Florida: CRC Press; 1983. p. 2-78.

O'Connor K, Metcalfe N, Taylor A. Does darkening signal submission in territorial contests between juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*? *Animal Behaviour* 1999;58:1269-76.

Ohnishi K. Effects of telencephalic ablation on short-term memory and attention in goldfish. *Behav Brain Res* 1997;86:191-9.

Oliveira R, McGregor P, Latruffe C. Know thine enemy: fighting fish gather information from observing conspecific interactions. *Proceedings of Royal Society of London B, Biological Sciences* 1998;265:1045-49.

Paquet D, Bhat R, Sydow A, Mandelkow EM, Berg S, Hellberg S, Falting J, Distel M, Koster RW, Schmid B, Haass C. A zebrafish model of tauopathy allows *in vivo* imaging of neuronal cell death and drug evaluation. *J Clin Invest* 2009;119:1382-95.

Pollard HB, Kuijpers GA, Adeyemo OM, Youdim MB, Goping G. The MPTP-induced parkinsonian syndrome in the goldfish is associated with major cell destruction in the forebrain and subtle changes in the optic tectum. *Exp Neurol* 1996;142:170-8.

Portavella M, Vargas JP, Torres B, Salas C. The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in goldfish. *Brain Res Bull* 2002;57:397-9.

Prechtl JC, von der Emde G, Wolfart J, Karamursel S, Akoev GN, Andrianov YN, Bullock TH. Sensory processing in the pallium of a mormyrid fish. *J Neurosci* 1998;18:7381-93.

Puzdrowski RL. Afferent projections of the trigeminal nerve in the goldfish, Carassius auratus. *J Morphol* 1988;198:131-47.

Rademacher DJ, Weber DN, Hillard CJ. Waterborne lead exposure affects brain endocannabinoid content in male but not female fathead minnows (Pimephales promelas). *Neurotoxicology* 2005;26:9-15.

Rakers S, Gebert M, Uppalapati S, Meyer W, Maderson P, Sell AF, Kruse C, Paus R. 'Fish matters': the relevance of fish skin biology to investigative dermatology. *Exp Dermatol* 19:313-24.

Romanes G. Mental Evolution in Animals. New York: AMS press; 1884, ristampato nel 1969. 411 p,Rose J. Anthropomorohism and 'mental welfare' of fishes. *Disease of aquatic organisms* 2007;75:139-54.

Saidel WM, Marquez-Houston K, Butler AB. Identification of visual pallial telencephalon in the goldfish, Carassius auratus: a combined cytochrome oxidase and electrophysiological study. *Brain Res* 2001;919:82-93.

Schreck C, Jonsson L, Feist G, Reno P. Conditioning improves performance of juvenile chinook salmon, Oncorhynchus tshawytscha to transportation stress. *Aquaculture* 1995;135:99-110.

Sfakianakis D, Georgakopoulou E, Papadakis E, Divanach P, Kentouri M, Koumoundouros G. Environmental determinants of haemal lordosis in European sea bass Dicentrarchus labrax. *Aquaculture* 2006;254:54-64.

Smith K, Able K. Dissolved oxygen dynamics in salt marsh pools and its potential impacts on fish assemblages. *Marine Ecology Progress Series* 2003;258:223-32.

Sneddon L, Braithwaite V, Gentle M. Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proceedings of Royal Society of London B, Biological Sciences* 2003;270:1115-21.

Sneddon LU. Anatomical and electrophysiological analysis of the trigeminal nerve in a teleost fish, Oncorhynchus mykiss. *Neurosci Lett* 2002;319:167-71.

Son OL, Kim HT, Ji MH, Yoo KW, Rhee M, Kim CH. Cloning and expression analysis of a Parkinson's disease gene, uch-L1, and its promoter in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:601-7.

Steffensen J, Farrell A. Swimming performance, venous oxygen tension and cardiac performance of coronary-ligated rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, exposed to progressive hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 1998;199:585-92.

Stoner A. Effects of environmental variables on fish feeding ecology: implications for the performance of baited fishing gear and stock assessment. *Journal of Fish Biology* 2004;65:1445-71.

Sumpter J. The endocrinology of stress. In: Iwama G, Pickering A, Sumpter J, Schreck C, (Ed.). *Fish stress and health in aquaculture, Society for Experimental Biology.* Cambridge: Cambridge University Press; 1997. p. 95-118.

Talbot WS, Hopkins N. Zebrafish mutations and functional analysis of the vertebrate genome. *Genes Dev* 2000;14:755-62.

Tiedeken JA, Ramsdell JS. Embryonic exposure to domoic Acid increases the susceptibility of zebrafish larvae to the chemical convulsant pentylenetetrazole. *Environ Health Perspect* 2007;115:1547-52.

Topàl J, Csànyi V. Interactive learning in the paradise fish (Macopodus opercularis). an ethological interpretation of the second-order conditioning paradigm. *Animal cognition* 1999;2:197-206.

Vargas JP, Rodr inverted question markiguez F, JC Liqm, Arias JL, Salas C. Spatial learning-induced increase in the argyrophilic nucleolar organizer region of dorsolateral telencephalic neurons in goldfish. *Brain Res* 2000;865:77-84.

Varsamos S, Flik G, pepin J, Wendelaar Bonga S, Breuil G. Husbandry stress during early stages affects the stress response and health status of juvenile sea bass, Dicentrarchus labrax. *Fish and Shellfish Immunology* 2006;20:83-96.

Weld MM, Maler L. Substance P-like immunoreactivity in the brain of the gymnotiform fish Apteronotus leptorhynchus: presence of sex differences. *J Chem Neuroanat* 1992;5:107-29.

Wendelaar Bonga SE. The stress response in fish. *Physiol Rev* 1997;77:591-625.

Williams DE, Lech JJ, Buhler DR. Xenobiotics and xenoestrogens in fish: modulation of cytochrome P450 and carcinogenesis. *Mutat Res* 1998;399:179-92.

Winberg S, Lepage O. Elevation of brain 5-HT activity, POMC expression, and plasma cortisol in socially subordinate rainbow trout. *Am J Physiol* 1998;274:R645-54.

Wisenden B, Smith R. A re-evaluation of the effect of shoalmate familiarity on the proliferation of alarm substance cells in Ostariophysan fishes. *Journal of Fish Biology* 1998;53:841-46.

GLI ANIMALI GENETICAMENTE MODIFICATI NELLA NUOVA DIRETTIVA EUROPEA 2010/63

Alessandra Berry e Igor Branchi
Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La legislazione dell'Unione Europea (UE) include una vasta gamma di normative atte a tutelare il benessere animale. Queste riguardano la fauna selvatica, gli animali degli zoo, gli animali da fattoria, gli animali da reddito e, non ultimi, gli animali utilizzati a fini scientifici. Il 22 settembre 2010, l'UE ha adottato la Direttiva 2010/63/EU per regolamentare l'uso degli animali nella ricerca scientifica. Tale Direttiva è un aggiornamento della pre-esistente Direttiva 86/609/CEE in vigore dal 1986, e ha come principale obiettivo quello di migliorare la legislazione relativa all'uso degli animali nelle procedure sperimentali, ribadendo il principio delle tre R (Russell and Burch, 1959): "Sostituire" (*Replace*), "Ridurre" (*Reduce*) e "Perfezionare" (*Refine*) (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm). Come si evince nelle considerazioni iniziali della nuova Direttiva, dall'anno di pubblicazione della Direttiva 86/609/CEE, sono ora disponibili nuove conoscenze scientifiche con riguardo ai fattori che influenzano il benessere degli animali nonché alla loro capacità di provare ed esprimere dolore, sofferenza, angoscia e danno prolungato. Per tale motivo si rende necessario migliorare il benessere degli animali utilizzati nelle procedure scientifiche rafforzando le norme minime per la loro tutela in linea con i più recenti sviluppi scientifici. In ventiquattro anni sono stati fatti anche importanti progressi che hanno reso disponibili nuove tecnologie come ad esempio la produzione di animali geneticamente modificati che ha presentato, e continua a presentare, un'opportunità unica per la ricerca di base in campo biomedico. Secondo la nuova Direttiva 2010/63/EU il benessere di questi animali è tutelato al pari di tutte le altre specie utilizzate a scopi scientifici. L'inclusione dei "transgenici" nella nuova Direttiva rappresenta un enorme e imprescindibile passo in avanti, ma è sufficiente tutelare questi animali al pari di tutti gli altri?

Il lasso di tempo tra la pubblicazione delle due Direttive è di non scarso rilievo – ventiquattro anni – soprattutto se si tiene in considerazione che dagli anni ottanta in poi l'utilizzo degli animali geneticamente modificati è cresciuto esponenzialmente. A tal proposito, nell'aprile 1997 si è svolto il ventottesimo workshop dell'*European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM), che ha avuto come scopo principale sia quello di formulare una serie di linee guida per assistere le Autorità regolatorie nella stesura delle leggi nazionali relative all'uso degli animali transgenici – colmando così parzialmente il vuoto legislativo – sia quello di valutare l'utilizzo di tali animali nell'ottica del principio delle "tre R" (Mepham *et al*., 1998). Infatti, se da un lato animali geneticamente modificati possono contribuire a "Ridurre" l'utilizzo di soggetti sperimentali attraverso interventi mirati su specifici geni (molto più efficaci rispetto alla tradizionale selezione genetica ottenuta tramite accoppiamenti tra individui selezionati), d'altro canto le difficoltà tecniche legate alle procedure di generazione degli animali stessi (es. una bassa probabilità nella ricombinazione omologa) contribuiscono ad aumentare il numero dei soggetti necessari per il singolo "transgene" diminuendo così il potenziale di "riduzione" del targeting genetico.

I roditori, e il topo in particolare, sono la specie attualmente preferita nella sperimentazione animale per la sua nota prolificità (fino a 20 nuovi nati in un solo parto), i ridotti tempi di gestazione (19 giorni), le ridotte dimensioni e il basso costo di mantenimento. Il topo è stata,

negli anni '80, la prima specie animale manipolata per diventare "transgenica" (Palmiter *et al.* 1982; Palmiter *et al.* 1983).

Da allora, le tecniche si sono perfezionate grazie anche al progresso nelle conoscenze relative al genoma del topo e alla relativa facilità di manipolazione. Diversi autorevoli scienziati hanno chiaramente illustrato gli importanti vantaggi portati alla ricerca scientifica dall'applicazione dell'ingegneria genetica in questa specie (Crawley, 2000): i) *la specificità*, si possono scegliere i caratteri su cui lavorare, riducendo teoricamente al minimo le interferenze; ii) *la rapidità*, una data combinazione di caratteri può essere ottenuta in una generazione quando il "metodo della selezione" ha bisogno di un numero più elevato di generazioni per ottenere un risultato analogo; iii) *la flessibilità*, poiché il DNA (acido deossiribonucleico) è strutturato secondo le regole di un codice universale praticamente comune a tutte le specie viventi ed è quindi possibile trasferire materiale e informazioni genetiche tra specie filogeneticamente anche molto distanti e iv) *l'economia*, possono essere scelte specie animali che, come nel caso del topo, permettono di lavorare su un grande numero di individui in breve tempo e con costi ridotti. Tuttavia, le tecniche di ingegneria genetica per la produzione di animali geneticamente modificati portano con sé anche un numero di problematiche che, sebbene non ne limitino la portata scientifica, devono essere prese in seria considerazione al fine di evitare la produzione di dati di scarsa qualità. Ad esempio, i cambiamenti che possono insorgere in seguito alla modificazione di un gene, a partire da fasi precoci dell'ontogenesi, possono interferire con il normale programma di sviluppo dando luogo a cambiamenti fisiologici e/o comportamentali compensatori, portando così a fenotipi completamente inattesi nell'animale maturo (Newmark, 1989; Lipp and Wolfer, 1998). Vi sono inoltre altri fattori che possono confondere l'interpretazione del fenotipo, come l'inserimento di parte di geni adiacenti a quello su cui si vuole intervenire selettivamente, i cosiddetti geni "flanking", provenienti da un diverso background genetico, che possono introdurre una variabilità inaspettata difficilmente controllabile. Particolare attenzione poi andrebbe rivolta all'interazione tra la mutazione genetica indotta e l'ambiente genetico in cui essa si esprime, cioè lo specifico background genetico che caratterizza il ceppo murino utilizzato. Ad esempio, il ceppo 129, largamente impiegato per la produzione di knock-out, è caratterizzato da ridotte capacità di apprendimento, ipomobilità e ipoplasia del corpo calloso rendendoli poco adatti a studi comportamentali (Balogh *et al*., 1999); i topi C57BL6 sono suscettibili all'insorgenza di mutazioni che possono provocare sordità (Zheng and Johnson, 2001) mentre gli FVB possono subire degenerazione retinale fornendo ridotte prestazioni in test che implicano rispettivamente l'uso dell'udito e delle capacità visive.

Inoltre, nelle prime fasi della vita postnatale il comportamento materno dei roditori altriciali influenza fortemente lo sviluppo neurobiologico della prole. In questo contesto, mutazioni, anche in un singolo gene, possono comportare profonde alterazioni del comportamento materno, influenzando indirettamente lo sviluppo della generazione successiva. Infine, la pleiotropia, il fenomeno per il quale un singolo gene influenza più caratteri dello stesso organismo, rende estremamente difficile predire gli effetti biologici globali della mutazione anche di un singolo gene (per una rivisitazione critica sull'argomento si veda Gingrich e Hen, 2000, e Gerlai, 1996). A questo proposito è importante considerare che la generazione di topi mutanti può a volte provocare effetti aspecifici non gravi ma che, se non sufficientemente caratterizzati, possono interferire con la valutazione di risposte fisiologiche e/o comportamentali a specifici stimoli portando a possibili interpretazioni confondenti del fenotipo. Ad esempio, in test cognitivi basati sulla capacità visiva del soggetto sperimentale per l'apprendimento di un compito spaziale (es. labirinto acquatico di Morris), se il rischio di ipovisione non è stato accuratamente valutato, si può attribuire un significato erroneo alle prestazioni del soggetto geneticamente modificato, incorrendo in falsi positivi o negativi. Gli effetti aspecifici possono anche essere di

grave entità come ad esempio un'alta mortalità prenatale e neonatale e un peso fetale anormalmente aumentato o diminuito. Inoltre, è necessario controllare gli effetti della manipolazione genetica sulla sofferenza psicofisica o sulla soglia del dolore. Per esempio, iper- o ipoalgesia (accentuata o viceversa ridotta sensibilità dolorifica), difficoltà locomotorie o sensoriali, scarsa capacità di interazione sociale, ecc., possono rendere l'animale particolarmente suscettibile a situazioni generanti stress o dolore. È comunque importante considerare che, sebbene gran parte dei topi transgenici venga utilizzata come modello di patologie umane, lo studio della funzione di un gene può, in alcuni casi, prevedere manipolazioni genetiche in grado di apportare benefici agli animali modificati. Ad esempio l'inserzione nel genoma di geni che conferiscono resistenza alle malattie può aumentare il benessere dell'animale modificato rispetto a quello del fenotipo selvatico (Petrocelli *et al*., 2003).

Sulla base di queste considerazioni, appare quindi evidente, nello specifico contesto di esperimenti che prevedano l'impiego di individui geneticamente modificati, l'importanza del problema del benessere animale, che andrebbe considerato in modo specifico e peculiare, valutando le alterazioni genotipiche e, di conseguenza, fenotipiche dei soggetti in esame (Hazecamp *et al*., 1998; Duncan e Fraser, 1997; Vitale e Alleva, 1999; De Cock e Buning, 1999). A tal proposito, nella nuova Direttiva europea 2010/63, all'articolo 3 viene fornita la definizione di "procedura" come qualsiasi uso, invasivo o non invasivo, di un animale a fini sperimentali o ad altri fini scientifici dal risultato noto o ignoto, o a fini educativi, che possa causare all'animale un livello di dolore, sofferenza, angoscia o danno prolungato equivalente o superiore a quello provocato dall'inserimento di un ago conformemente alle buone prassi veterinarie. Ciò include qualsiasi azione che intenda o possa determinare la nascita o la schiusa di un animale o la creazione e il mantenimento di una linea di animali geneticamente modificata in queste condizioni. A riguardo, l'attuale Decreto legislativo 116/1992 considera "esperimento" la nascita di un animale in condizioni di dolore, tuttavia non fa alcun riferimento al mantenimento di colonie geneticamente modificate portatrici di un fenotipo sofferente.

Ancora, nella nuova Direttiva 2010/63/UE, per quanto riguarda la fine di una procedura, contemplata dall'articolo 17, essa viene definita non solamente come la fine della necessità di effettuare nuove osservazioni, ma anche, riferendosi agli animali geneticamente modificati, quando non è più riscontrato o previsto per la discendenza un livello di dolore, sofferenza, angoscia o danno prolungato equivalente o superiore a quello provocato dall'inserimento di un ago. Altro aspetto della nuova Direttiva 2010/63/UE è la classificazione della gravità delle procedure in quattro gruppi: "non risveglio", "lievi", "moderate" e "gravi", a cui fa riferimento l'articolo 15. Nello specifico, nell'allegato VIII, Sezione III, vengono riportati come esempi di procedure "lievi" la riproduzione di animali geneticamente modificati da cui dovrebbe risultare un fenotipo con effetti lievi e la combinazione o l'accumulo degli esempi seguenti: (i) valutazione della composizione corporea con tecniche non invasive e contenimento fisico minimo; (ii) controllo elettrocardiografico con tecniche non invasive e contenimento fisico minimo o nullo di animali abituati; (iii) applicazione di dispositivi telemetrici esterni che non causano probabilmente alcuna menomazione ad animali socialmente abituati e non interferiscono con l'attività e il comportamento normali; (iv) riproduzione di animali geneticamente modificati da cui non dovrebbe risultare un fenotipo avverso clinicamente riscontrabile; (v) aggiunta di marker inerti alla dieta per seguire il passaggio del contenuto gastrointestinale; (vi) sospensione dell'alimentazione per <24 ore nei ratti adulti; (vii) sperimentazione in ambiente naturale. Vengono invece classificati come esempi di procedure "moderate" la riproduzione di animali geneticamente modificati da cui dovrebbe risultare un fenotipo con effetti moderati; e la creazione di animali geneticamente modificati mediante procedure chirurgiche.

Chiunque lavori con animali transgenici dovrebbe essere consapevole di come valutare il benessere al fine di evitare l'insorgenza di uno stato di malessere (Petrocelli *et al*., 2003). È possibile, attraverso la valutazione di alcuni parametri, ottenere informazioni preziose sul loro benessere. Tali parametri includono, ad esempio, la manifestazione di determinati comportamenti specie-specifici e gli indicatori comportamentali e fisiologici di "piacere" (inteso come soddisfazione delle necessità fisiologiche). Al contrario esiste una vasta gamma di misure relative alla mancanza di benessere: stereotipie, riduzione dell'aspettativa di vita, della capacità di crescita e riproduzione; insorgenza di patologie; immunosoppressione; sforzi fisiologici e comportamentali per interagire con l'ambiente circostante, ecc., solo per citarne alcuni (Broom e Johnson, 1993). Dal punto di vista del benessere animale, ai topi geneticamente modificati devono essere fornite garanzie di alti livelli di mantenimento. Per questo motivo, tutte le procedure operative standard relative alla gestione della stabulazione dovrebbero essere effettuate da uno staff di persone in grado di valutare i diversi aspetti legati alle specifiche necessità relative al benessere di questi individui. In particolare, le conoscenze etologiche possono e debbono essere utilizzate per migliorare le condizioni di vita dei roditori usati nella sperimentazione animale, in particolare nel caso dei topi transgenici (Vitale e Alleva, 1999; Alleva e Carere, 2000). Van der Meer e colleghi ad esempio suggeriscono che stabularisti, che abbiano seguito corsi di formazione specifici, monitorino quotidianamente l'animale transgenico a partire dalla nascita, adoperando moduli standardizzati che permettano la raccolta di informazioni riguardanti, ad esempio, la postura o la reattività dell'animale sperimentale. Inoltre sarebbe importante che il monitoraggio non fosse limitato alla prima generazione ma che includesse almeno due generazioni successive, prestando particolare attenzione al comportamento riproduttivo, alla gestazione, alla capacità di allevare i piccoli e al numero di nati (Van der Meer, 2001). Altri elementi utili nella valutazione del benessere dell'animale geneticamente modificato dovrebbero tenere in considerazione l'osservazione del comportamento sociale. La procedura di pulizia della gabbia rappresenta un'occasione per tali osservazioni in quanto destabilizza l'equilibrio gerarchico all'interno di gruppi di maschi, permettendo di esaminare i comportamenti agonistici (Gray e Hurst, 1995). Tali comportamenti sono mediati da stimoli olfattivi emanati dal corpo e dalle deiezioni presenti sulla lettiera (particolarmente l'urina). Questi stimoli sono coinvolti nella comunicazione del ruolo sociale di dominanza sul territorio (gabbia) e nel riconoscimento e mantenimento della tolleranza sociale fra individui familiari. Così alterazioni nel comportamento sociale potrebbero facilmente essere osservabili a seguito della routinaria procedura di pulizia delle gabbie da parte del personale addetto alla stabulazione, con un investimento minimo in termini di tempo e di finanziamenti. Sebbene gli animali geneticamente modificati non siano specificamente menzionati, la Direttiva 2010/63/UE riporta come il benessere degli animali usati nelle procedure dipenda fortemente dalla qualità e dalle competenze professionali del personale incaricato della supervisione delle procedure, di coloro i quali le attuano, nonché di coloro i quali controllano chi si occupa degli animali su base giornaliera. Gli Stati membri dovrebbero assicurare, attraverso autorizzazioni o con altri mezzi, che il personale sia adeguatamente istruito, formato e competente. Inoltre, è importante che il personale sia supervisionato finché non dimostri di aver acquisito le competenze necessarie. Linee guida non vincolanti, a livello dell'Unione, in tema di obblighi scolastici potrebbero favorire, sul lungo termine, la libera circolazione del personale.

Benché il topo sia la specie animale oggi più utilizzata nell'ambito delle scienze biomediche, anche altre specie, quali ovini e suini, sono sempre più impiegate nell'ambito dell'ingegneria genetica; di conseguenza, le problematiche, soprattutto a carattere bioetico, legate alle nuove biotecnologie debbono essere seriamente considerate anche per queste specie. Un potenziale problema associato all'uso di animali geneticamente modificati è quello della contaminazione dell'ecosistema. Sebbene tale evenienza sia assai improbabile, in quanto tutti gli studi condotti

finora hanno dimostrato come gli animali geneticamente modificati abbiamo notevoli difficoltà ad adattarsi all'ambiente naturale, questa non può essere esclusa. Infatti, la fuga di questi soggetti potrebbe portare alla "contaminazione" progressiva di colonie naturali circostanti (soprattutto nel caso di animali di dimensioni ridotte quali piccoli roditori). La prevenzione di tale evento indesiderato deve divenire una priorità per i laboratori che contengano animali geneticamente modificati. Un approccio preventivo attendibile ed efficace dovrebbe includere appropriate barriere per impedire eventuali fughe. In un'ottica più filosofica è comunque importante considerare se l'utilizzo delle nuove tecnologie genetiche possa inficiare in qualsiasi modo la biodiversità, se non siano incompatibili con il rispetto per la vita o se non rappresentino un mero sfruttamento della vita animale violandone la dignità (Petrocelli *et al*., 2003). Di fronte a tali incertezze si dovranno adottare misure precauzionali per la tutela dell'essere vivente.

In conclusione, dall'applicazione della Direttiva 86/609/CEE sono stati fatti importanti progressi in campo scientifico inclusa la vastissima diffusione di animali geneticamente modificati. A ventiquattro anni di distanza la nuova Direttiva 2010/63/EU, con l'inclusione degli animali transgenici nella tutela del benessere degli animali di laboratorio, ha effettuato un necessario e imprescindibile passo avanti. Tuttavia, considerati i delicati aspetti legati alla loro intrinseca condizione biologica e a caratteristiche fenotipiche non sempre facilmente valutabili e prevedibili, riteniamo che il benessere degli animali transgenici meriti particolari attenzioni non ancora pienamente contemplate in questa Direttiva.

Ringraziamenti

Si ringraziano Sara Capoccia e Veronica Bellisario per il reperimento del materiale bibliografico e per gli utili commenti durante la stesura di questo contributo.

Bibliografia

Alleva E, Carere C. Etologia. In: *Appendice 2000. Istituto della Enciclopedia Italiana "Giovanni Treccani".* Roma: Enciclopedia italiana "Giovanni Treccani"; 2000. p. 625-9.

Balogh SA, McDowell CS, Stavnezer AJ, Denenberg VH. A behavioral and neuroanatomical assessment of an inbred substrain of 129 mice with behavioral comparisons to C57BL/6J mice. *Brain Res* 1999;836:38-48.

Broom DM, Johnson KG. *Stress and animal welfare (Chapman & Hall Animal Behaviour Series).* London: Kluwer Academic Publisher; 1993. p. 211.

Crawley JN. *What's Wrong with My Mouse?: Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice.* John Wiley & Sons Inc.; 2000.

De Cock Buning T. The real role of intrinsic value in ethical review committees. In: Dol M, Fentener van Vlissingen M, Kasanmoentalib S, Visser T, Zwart H (Ed.). *Recognising the intrinsic value of animals, beyond animal welfare.* Assen, The Netherlands: Van Gorcum; 1999; p. 133-9.

Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 1982;300:611-5.

Duncan IJH, Fraser D. Understanding animal welfare. In: Appleby MC, Hughes BO (Ed.). *Animal welfare.* Wallingford: Can International; 1997. p. 19-31.

Gerlai R. Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *TINS* 1996;19:177-181.

Gingrich JA, Hen R. The broken mouse: the role of development, plasticity and environment in the interpretation of phenotypic changes in knockout mice. *Curr Opin Neurobiol* 2000;10:146-52.

Gray S, Hurst JL. The effects of cage cleaning on aggression within groups of male laboratory mice. *Animal Behaviour* 1995;49:821-6.

Hazecamp A, De Cock Buning T. *Health and welfare of transgenic farm animals: Past, present and presepecitves.* Leiden: University of Leiden; 1998.

Lipp HP,Wolfer DP. Genetically modified mice and cognition. *Curr Opin Neurobiol* 1998;8:272-80.

Mepham TB, Combes RD, Balls M, Barbieri O, Blokhuis HJ, Costa P, *et al.* The Use of Transgenic Animals in the European Union. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop. *ATLA* 1998;26:21-43.

Newmark P. Guidelines produced for the use of transgenic animals in research. *Nature* 1989;337:295.

Palmiter RD, Norstedt G, Gelinas RE, Hammer RE, Brinster RL. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. Science 1983;222:809-14.

Petrocelli A, Rodriguez D, Spadafora C, Tamino G, Zannini P.Transgenesi. In: Ravarotto L, Pegoraro R. (Ed.). *Transgenesi Clonazione Xenotrapianto. Analisi scientifica, giuridica ed etica sull'impiego degli animali.* Padova: Piccin; 2003. p. 13-41.

Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique.* London: Methuen; 1959. Reprinted by Universities Federation for Animal Welfare; 1992.

Van der Meer M, Rolls A, Baumans V, Olivier B, van Zutphen LFM. Use of score sheets for welfare assessment of transgenic mice. Laboratory Animals Ltd. *Laboratory Animals* 2001;35:379-89.

Vitale A, Alleva E. Ethological and welfare considerations in the study of aggression in rodents and nonhuman primates. In: Haug M, Whalen RE (Ed.). *Animal models of human emotion and cognition.* Washington: American Psychological Association; 1999. p. 283-95.

Zheng QY, Johnson KR. Hearing loss associated with the modifier of deaf waddler (mdfw) locus corresponds with age-related hearing loss in 12 inbred strains of mice. *Hearing Research* 2001;154:45-53.

PROGETTO EATRIS: IL BENESSERE ANIMALE NELLA PROSPETTIVA DELLA RICERCA TRASLAZIONALE

Gemma Calamandrei
Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità

Introduzione

La ricerca traslazionale in biomedicina mira a trasferire i risultati della ricerca di base condotta in laboratorio alla pratica clinica (1, 2). Il percorso traslazionale include obbligatoriamente tra le fasi previste per l'immissione di un farmaco o di una terapia sul mercato gli studi preclinici condotti su modelli sperimentali animali. I modelli sperimentali rappresentano un supporto di fondamentale importanza nel processo di traduzione delle scoperte di laboratorio in applicazioni cliniche per la prevenzione, la diagnosi e la terapia basata su nuovi farmaci. I modelli sperimentali più utilizzati nella ricerca preclinica su molte patologie umane sono di fatto costituiti da modelli animali, in maggioranza roditori spesso transgenici o difettivi per geni presumibilmente coinvolti nella patogenesi di diverse patologie (3, 4). L'identificazione di parametri fisiologici e comportamentali con validità di costrutto e di sintomo, che fungano da indicatori affidabili per l'efficacia di nuove terapie da introdurre nella pratica clinica, è un obiettivo centrale della ricerca sui modelli animali (5). Gli aspetti normativi relativi al benessere degli animali utilizzati nella ricerca preclinica assumono un ruolo rilevante in questo contesto, e richiedono un approccio trans-nazionale nella prospettiva dello sviluppo di infrastrutture europee dedicate alla ricerca traslazionale (6).

Il progetto EATRIS

A partire dal 2006 l'Unione Europea ha promosso la costituzione di un gruppo di infrastrutture a sostegno della ricerca traslazionale in biomedicina (7), attraverso l'avvio di progetti specifici, quali il progetto EATRIS (*European Advanced Translational Research Infrastructure in Medicine* http://www.eatris.fr/EATRIS.aspx). EATRIS ha avuto come obiettivo principale la costruzione di un piano dettagliato per la realizzazione di una rete di strutture distribuite sul territorio europeo, ognuna delle quali dotata di tecnologie d'avanguardia e dedicate alla validazione *in vitro* e *in vivo* di agenti e approcci terapeutici e all'identificazione di procedure diagnostiche innovative. Alla fase preparatoria, iniziata nel 2008 e terminata a dicembre 2010, hanno partecipato Danimarca, Finlandia, Francia, Germania, Italia, Paesi Bassi, Norvegia, Regno Unito, Svezia e Spagna.

Nella fase di implementazione appena iniziata, EATRIS fornirà supporto a progetti di ricerca traslazionale che abbiano già superato la fase del proof-of-principle, cioè dell'indicazione di potenziale fattibilità e utilità della traduzione di una scoperta scientifica in una applicazione clinica. EATRIS intende sostenere tutte le fasi del processo traslazionale fino alla fase di proof-of-concept nell'uomo, cioè fino alla sperimentazione clinica di fase I-IIa, favorendo sia la ricerca accademica no-profit con importanti ricadute sanitarie potenziali, sia le fasi di ricerca e

sviluppo orientate ad un trasferimento dei risultati all'industria che proseguirà nella fase di sviluppo e commercializzazione. Un primo nucleo di aree di patologia oggetto di interesse di EATRIS include cancro, malattie metaboliche, malattie neurologiche, malattie cardiovascolari e malattie infettive. Particolare attenzione sarà dedicata alle malattie rare e orfane.

Ciascuna infrastruttura nazionale dovrà garantire interdisciplinarietà e integrazione tra i diversi livelli di analisi, e lavorare secondo percorsi standardizzati comuni tra i diversi Paesi Europei. La possibilità di stabilire una rete di strutture di ricerca che cooperano anche attraverso gli scambi di personale e l'utilizzo comune di apparecchiature, animali e la condivisione di procedure sperimentali ha come prerequisito la standardizzazione delle conoscenze e delle competenze in ambito regolatorio.

Ruolo dell'Istituto Superiore di Sanità nel progetto EATRIS

L'Istituto Superiore di Sanità (ISS), oltre a coordinare la rete di strutture di ricerca italiane disponibili a sviluppare aree specifiche della ricerca traslazionale, ha dato un contributo importante all'attuazione del progetto EATRIS: l'ISS è stato infatti responsabile del Work Package 8 (WP8: *Regulatory issues relevant for a joint EATRIS infrastructure*) che aveva come scopo la definizione di un insieme di regole e raccomandazioni condivise dai vari centri EATRIS riguardanti gli aspetti etici e regolatori importanti per la ricerca traslazionale in medicina.

Uno degli aspetti che sono stati affrontati nell'ambito del WP8 ha riguardato l'armonizzazione delle procedure che prevedono l'utilizzo di animali nella ricerca preclinica. A questo scopo si è costituito un gruppo di lavoro specifico (al quale hanno preso parte ricercatori afferenti al Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze con competenze etologiche, di neuroscienze comportamentali e di etica della sperimentazione) che aveva l'obiettivo di: i) effettuare una rassegna aggiornata sulle normative nazionali che regolano la sperimentazione animale negli Stati Membri partecipanti ad EATRIS, e ii) proporre alcune raccomandazioni prioritarie per favorire l'armonizzazione di tali normative nella prospettiva di un'infrastruttura di medicina traslazionale.

Il gruppo di lavoro ha iniziato la ricognizione nella prima metà del 2008: in quella fase era ancora vigente la Direttiva EU 86/609/EEC, e si era nel vivo del percorso di revisione della stessa, che ha portato al varo della nuova Direttiva nell'ottobre 2010. In un quadro normativo in via di modificazione, si è scelto di proporre ai dieci Stati Membri partecipanti ad EATRIS un questionario che, oltre a porre una serie di domande sull'impostazione generale delle relative normative nazionali, fornisse informazioni aggiornate su alcune questioni controverse affrontate nella preparazione della nuova Direttiva, quali ad esempio la regolamentazione della generazione e dell'uso di animali transgenici, gli studi su tessuti embrionali, il ruolo dei Comitati Etici, l'impiego dei primati non umani. Il questionario è stato inviato, attraverso i referenti per il progetto EATRIS nei singoli Paesi, alle autorità competenti che in ciascun Paese sono responsabili dell'approvazione dei protocolli sperimentali che prevedono l'impiego di animali. Sono di seguito descritti i risultati più rilevanti relativi all'indagine svolta nell'ambito di EATRIS sulle normative nazionali che regolano attualmente l'impiego degli animali in sperimentazione biomedica nei dieci dieci Stati Membri dell'EU che hanno partecipato alla fase preparatoria di EATRIS.

Sperimentazione animale e normative nazionali nei Paesi partecipanti ad EATRIS

La prima parte del questionario constava di domande relative alle normative vigenti nei rispettivi Paesi nel quadro della Direttiva EU 86/609/EEC. Tutte le legislazioni nazionali attualmente vigenti hanno recepito la Direttiva in senso più restrittivo, regolando l'utilizzo di animali nella sperimentazione in diverse aree di ricerca, comprendendo non solo la ricerca di base e quella applicata ma anche i test regolatori (es. preliminari alla sperimentazione di farmaci nell'uomo), i controlli di qualità e gli esperimenti mirati alla formazione universitaria. Le specie animali considerate nelle rispettive legislazioni nazionali includono tutti i vertebrati, mentre il Regno Unito ha esteso la protezione agli Octopodi e la Norvegia ai Decapodi.

Le maggiori differenze sono state riscontrate in alcuni punti critici, quali il percorso di autorizzazione alla sperimentazione, la composizione e il ruolo dei comitati etici nello stesso, la formazione del personale coinvolto nella sperimentazione animale. In particolare, poiché la Direttiva 86/609/EEC non richiedeva obbligatoriamente l'autorizzazione allo svolgimento di sperimentazioni su animali, ciascun Paese ha implementato un proprio quadro di regole per tale autorizzazione. È importante sottolineare che in Europa 18 Paesi membri su 25 hanno una forma istituzionalizzata di valutazione etica a livello nazionale, con ruoli e peso differente nei vari Paesi. I dieci Paesi europei partecipanti ad EATRIS riflettono le diversità riscontrate nell'Europa a 25. La maggioranza dei Paesi intervistati si sono dotati di un sistema nazionale di autorizzazione, anche se gestito da autorità diverse (il Ministero degli Interni nel Regno Unito, il Ministero della Salute in Italia, il Ministero dell'Agricoltura in Francia, un'Agenzia specifica come la National Animal Research Autority in Norvegia), mentre la Germania e l'Olanda hanno scelto di decentrare il proprio sistema di autorizzazione al governo locale. La diversità nei livelli regolatori è stata riscontrata anche rispetto alla natura e al ruolo dei Comitati Etici nel rilascio dell'autorizzazione (l'Italia è l'unico Paese tra i partecipanti ad EATRIS a non prevedere l'intervento di una tale struttura nel percorso di autorizzazione). Alcuni Paesi ricorrono a Comitati Etici istituzionali (valutazione all'interno dell'Istituzione a cui appartiene il ricercatore che intende effettuare una data sperimentazione) o a Comitati Etici Nazionali, con membri provenienti da diverse aree disciplinari. In alcuni casi entrambi i livelli di valutazione vengono utilizzati qualora vi siano valutazioni contrastanti a livello istituzionale. Le figure che partecipano alla valutazione etica, il potere decisionale dei comitati etici, e i tempi necessari alla decisione di autorizzare o meno un dato progetto (si va da un minimo di 1 mese ai 6 mesi dell'Italia) sono diversi nei dieci Paesi intervistati. Anche il grado di accessibilità all'informazione sui protocolli sperimentali autorizzati varia nei diversi Paesi: per esempio Regno Unito, Francia e Germania non forniscono informazioni in merito, mentre Olanda e Danimarca adottano una regola di completa trasparenza, con l'eccezione del nome del responsabile.

Un altro aspetto sul quale sono emerse significative differenze tra i Paesi consultati è quello relativo alla formazione del personale coinvolto nella sperimentazione animale. La Direttiva 86/609/EEC non dava requisiti per la formazione del personale, e perciò ogni Paese si è dato procedure proprie, solo in alcuni casi come l'Olanda riferendosi alle linee guida FELASA (9). Mentre alcuni Paesi prevedono obbligatoriamente che ogni persona coinvolta nella sperimentazione su animali abbia seguito corsi pratici o teorici, o una combinazione di entrambi, altri Paesi non si sono dotati di corsi accreditati in questo settore, e la formazione è lasciata alla singola istituzione di ricerca o università.

La disomogeneità del quadro regolatorio è apparsa ancora più evidente esaminando i risultati del questionario relativi a questioni non specificamente affrontate dalla vecchia Direttiva. Su un

aspetto specifico, quello della generazione di animali transgenici e del loro impiego nella sperimentazione, la maggioranza dei Paesi europei e in particolare quelli partecipanti ad EATRIS hanno sviluppato norme *ad hoc*, spesso all'interno di leggi che regolano più in generale la possibilità di produrre organismi geneticamente modificati, con riferimento alle Direttive EU in proposito. L'uso di animali geneticamente modificati è invece solitamente considerato all'interno delle legislazioni nazionali sulla sperimentazione animale.

Infine anche sulla sperimentazione sui primati non umani si sono riscontrate significative differenze tra i Paesi EATRIS: tra i Paesi intervistati, Regno Unito, Francia e Germania sono quelli nei quali è utilizzato il maggior numero di primati non umani (scimmie del Vecchio e Nuovo Mondo) nella sperimentazione. La Norvegia ha invece proibito del tutto l'impiego di primati non umani. La sperimentazione sulle scimmie antropomorfe è bandita in Olanda e nel Regno Unito, e parzialmente bandita in Svezia. In Italia qualsiasi esperimento che coinvolga primati non umani necessita di un protocollo autorizzato, anche se si tratta di puri studi osservazionali. È noto che questo argomento è stato oggetto di un acceso dibattito nel corso della preparazione della nuova Direttiva (si rimanda al contributo di Perretta in questo stesso volume).

Raccomandazioni del gruppo di lavoro

L'analisi dei risultati del questionario ha confermato che il quadro regolatorio relativo all'impiego degli animali nella sperimentazione è estremamente frammentato e diversificato, anche solo quando si analizzino le situazioni dei dieci Paesi che hanno partecipato alla fase preparatoria di EATRIS, nei quali la sensibilità etica e culturale ai temi del benessere animale è particolarmente sviluppata. È immaginabile che il quadro sia ancora più diversificato quando si considerino i 27 Paesi membri dell'EU, che nei prossimi anni potranno partecipare a pieno titolo con le proprie infrastrutture di ricerca all'implementazione del progetto EATRIS.

In seguito all'elaborazione dei dati raccolti nell'ambito di EATRIS, il gruppo di lavoro ha identificato tre temi sui quali sarebbe auspicabile l'armonizzazione a livello europeo nella prospettiva di una sempre più stretta integrazione tra le infrastrutture per la ricerca traslazionale in biomedicina. Il primo tema riguarda la necessità di rendere quanto più possibile simile (al di là delle ovvie differenze nazionali) il percorso di autorizzazione alla sperimentazione. Questo obiettivo potrebbe essere raggiunto assegnando un ruolo importante nella valutazione dei protocolli a comitati etici istituzionali o locali, in linea con le raccomandazioni FELASA (8). Questo assicurerebbe una valutazione più stringente legata alla qualità delle strutture di stabulazione, al tipo di ricerche svolte (prevalenza di attività con caratteristiche regolatorie o di attività di ricerca fondamentale) e alla specializzazione del personale coinvolto nella sperimentazione. Al livello locale dovrebbe aggiungersi un livello di valutazione nazionale, che assicuri l'armonizzazione dei criteri di valutazione secondo linee guida stabilite dalla legislazione nazionale, intervenga in caso di conflitti nei giudizi di valutazione a livello locale, e assicuri il monitoraggio dei processi locali. Dovrebbe essere estesa la possibilità di autorizzare progetti collaborativi svolti in diverse istituzioni, fino ad ora consentita solo alle ricerche in ambito regolatorio, anche alle ricerche di base, con un significativo risparmio di tempo dovuto alla riduzione della burocrazia. Infine dovrebbero essere applicate regole più stringenti in merito ai tempi di rilascio delle autorizzazioni, stabilendo tempi massimi entro i quali garantire l'espletamento dell'intero processo.

Un secondo tema rilevante, che ha ricadute importanti sul benessere degli animali utilizzati nella sperimentazione, riguarda le condizioni di mantenimento degli animali. L'allargamento del concetto di *Refinement* (9) implica che la riconsiderazione degli spazi fisici nei quali gli animali vengono mantenuti deve tenere conto degli specifici bisogni etologici e fisiologici delle specie

utilizzate. Una garanzia per l'armonizzazione in questo campo potrebbe essere l'adozione delle specifiche sancite nell'Allegato A della Convenzione Europea ETS 123. La maggioranza delle indicazione e delle raccomandazioni dell'Allegato A, in merito alle condizioni di mantenimento, di trasporto, alle procedure di identificazione e di registrazione degli animali, sono applicate in molti Paesi europei e sono parte integrale di pratiche di stabulazione condotte secondo principi di qualità. Tuttavia alcuni aspetti necessitano di essere implementati, quali la dimensione delle gabbie di alloggiamento, l'uso obbligatorio degli arricchimenti ambientali e del mantenimento di alcune specie animali in gruppi sociali.

Il terzo aspetto critico sono le differenze nella formazione del personale coinvolto nella sperimentazione nei Paesi europei. La mancanza di un curriculum uniforme tra i diversi Paesi europei rappresenta un ostacolo alla mobilità del personale coinvolto nella sperimentazione animale, mobilità determinante nell'attivazione di collaborazioni scientifiche mirate allo sviluppo di metodi, tecnologie e prodotti che aumentino la competitività dell'Unione Europea in questo campo. L'integrazione obbligatoria di programmi specifici dedicati all'impiego degli animali nella sperimentazione, in stretto riferimento ai principi delle 3R, nei curricula della formazione universitaria e post universitaria consentirebbe, con un impegno economico relativamente ridotto, di stabilire un livello di base comune di preparazione. Sarebbe importante anche l'aggiornamento del personale già formato attraverso corsi obbligatori almeno ogni cinque anni.

Cosa cambia con la nuova Direttiva

Il recepimento della nuova Direttiva 2010/63/EC da parte dei 27 Stati membri rappresenta una straordinaria occasione per promuovere un processo di armonizzazione delle regole sull'uso e il benessere degli animali nella sperimentazione biomedica. Come la precedente Direttiva, anche la nuova Direttiva si configura come un quadro di riferimento che fornisce a ciascun Paese gli standard regolatori a cui adeguarsi: su alcune questioni "calde" anche la nuova Direttiva lascia una relativa discrezionalità ai singoli Paesi, ed è prevedibile che le differenti attitudini culturali nei confronti dell'etica della sperimentazione e del benessere animale presenti nei dieci Stati Membri si traducano in un quadro regolatorio altrettanto frammentato quanto quello evidenziato dal gruppo di lavoro EATRIS.

In un contesto di sempre più strette collaborazioni nella ricerca biomedica, le differenze negli ambiti precedentemente evidenziati rischiano, oltre che di inficiare la comparabilità e quindi la validità dei dati sperimentali raccolti in diverse infrastrutture europee, anche di creare differenze di sostenibilità economica dell'attività sperimentale stessa tra i diversi Paesi. Per chiarire questo aspetto, valga l'esempio seguente: l'adozione sic et simpliciter delle indicazioni contenute nella Direttiva sulla dimensione minima consentita per gli alloggiamenti delle diverse specie animali permette un risparmio dello spazio dedicato alla stabulazione in un'infrastruttura di ricerca, "sfavorendo" perciò in termini di costi per la costruzione dell'infrastruttura stessa il Paese che scelga invece di adottare soluzioni maggiormente rispettose delle necessità eco-etologiche delle specie in studio.

Tuttavia va riconosciuto che la nuova Direttiva si muove nella direzione di un'armonizzazione regolatoria, riconoscendo in più punti che tale armonizzazione è necessaria per aumentare la competitività dell'Unione Europea nel settore della ricerca e dell'innovazione scientifico/tecnologica. Molte della raccomandazioni elaborate dal gruppo di lavoro EATRIS trovano di fatto riscontro nella nuova Direttiva. Questa stabilisce infatti dei limiti di tempo per l'espletamento della procedura di autorizzazione, consente lo sveltimento amministrativo di alcune procedure qualora si tratti di esperimenti già autorizzati in precedenza e che vengano ripetuti, stabilisce linee guida per percorsi di formazione analoghi negli Stati Membri al fine di favorire lo

scambio di personale, prevede l'autorizzazione di gruppi di progetti anche nel caso di ricerche di base e con carattere traslazionale. Un punto importante è l'adozione nella nuova Direttiva 2010/63/EU (Annex III) delle Raccomandazioni 2007/526/EC sugli standard di mantenimento degli animali (10), che accoglievano quelle stabilite dalla revisione dell'Allegato A. Tuttavia alcuni aspetti richiederanno uno sforzo successivo di armonizzazione, al quale è chiamata tutta la comunità scientifica: è il caso per esempio dell'uso obbligatorio degli arricchimenti ambientali, la cui natura non viene però specificata nel testo. È evidente che la standardizzazione di tali procedure è dirimente per assicurare la comparabilità dei dati raccolti nei diversi laboratori europei. In conclusione la Direttiva 2010/63/EC rappresenta un terreno avanzato sul quale stabilire percorsi (anche inediti) di armonizzazione regolatoria tra gli Stati Membri, con il fondamentale contributo della comunità scientifica assieme ad altri portatori di interessi.

Bibliografia

1. Woolf SH. The meaning of translational research and why it matters. *JAMA* 2008;299:211-3.
2. Adams JU. Building the bridge from bench to bedside. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:463-4.
3. Magen I, Chesselet MF. Genetic mouse models of Parkinson's disease The state of the art. *Prog Brain Res*. 2010;184:53-87
4. de Jong M, Maina T Of mice and humans: are they the same?--Implications in cancer translational research. *J Nucl Med* 2010;51:501-4.
5. Wendler A, Wehling M. The translatability of animal models for clinical development: biomarkers and disease models. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10:601-6
6. Albani S, Prakken B. The advancement of translational medicine - from regional challenges to global solutions. *Nature Medicine* 2009;15:1006-9.
7. European Strategy Forum on Research Infrastructures. *European roadmap for research infrastructures. Report 2006.* Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2006. Disponibile all'indirizzo: http://ec.europa.eu/research/infrastructures/pdf/esfri/esfri_roadmap/roadmap_2006/esfri_roadmap_2006_en.pdf#view=fit&pagemode=none; ultima consultazione 26/01/2012.
8. FELASA Guidelines: FELASA recommendations on the education and training of persons working with laboratory animals: Categories A and C. *Laboratory Animals* 1995;29:121-31. Disponibile all'indirizzo: http://la.rsmjournals.com/content/29/2/121.full.pdf; ultima consultazione 3/2/2012.
9. Buchanan-Smith HM, Rennie AE, Vitale A, Pollo S, Prescott MJ, Morton DB. Harmonising the definition of refinement. *Animal Welfare* 2005;14:379-84.
10. Comunità Europea. 2007/526/EC. Raccomandazione della Commissione del 18 giugno 2007 relativa a linee guida per la sistemazione e la tutela degli animali impiegati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici *Gazzetta ufficiale della Comunità Europea* L197/1 del 30 luglio 2007. Disponibile all'indirizzo: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:IT:PDF; ultima consultazione 3/2/2012.

CRITERI DI SEVERITÀ DELLE PROCEDURE SPERIMENTALI NELLA NUOVA DIRETTIVA EUROPEA 2010/63/UE

Ana Criado e Alessia Ferrara
Aptuit SrL, Verona

Introduzione

Il parlamento Europeo e il consiglio direttivo dell'Unione Europea hanno adottato il 22 settembre scorso la Direttiva 2010/63/UE che disciplina le norme sulla protezione degli animali utilizzati ai fini scientifici. Negli ultimi anni infatti si sono rese disponibili nuove evidenze scientifiche relativamente agli elementi che influenzano il benessere degli animali e anche nuovi riferimenti normativi come il trattato di Lisbona che attribuiscono agli animali una reale capacitàsenziente, cioè di provare dolore, angoscia e soffereza. Alla luce di tali evidenze il testo dell a Direttiva prevede l'obbligo di migliorare il benessere degli animali utilizzati nelle procedure scientifiche rafforzando le norme minime per la loro tutela in linea con le più recenti conoscenze scientifiche. Tra le novità introdotte dalla nuova Direttiva 2010/63/EU è presente la richiesta specificata nell'Articolo 15 di classificare tutte le procedure caso per caso, come "non risveglio", "lievi", "moderate" o "gravi", secondo i criteri di assegnazione di cui all'allegato VIII. Inoltre, fatta salva la clausola di salvaguardia di cui all'articolo 55, paragrafo 3, gli Stati membri devono assicurare che una procedura non sia effettuata qualora causi dolore, sofferenza o angoscia intensi che potrebbero protrarsi e non possano essere alleviati. Per ciascuna categoria di severità l'Allegato VIII fornisce le definizioni di severità insieme ai criteri di assegnazione e alcuni esempi di procedure esperimentali Un altro aspetto innovativo strettamente collegato alla classificazione di severità delle procedure introdotto dalla Direttiva èdefinito all'articolo 39 come valutazione retrospettiva del raggiungimento degli obiettivi del progetto, del danno inflitto agli animali includendo il numero, la specie degli animali impiegati ela gravità delle procedure e qualunque ulteriore elemento che possa contribuire all'applicazione del principio delle 3R. Il recepimento della Nuova Direttiva nelle corrispondenti legislazioni nazionali è prevista per non oltre il 10 novembre 2012. Sarebbe quindi auspicabile, entro questa data trovare un approccio comune che garantisca consistenza nella applicazione della Direttiva tra i diversi Stati membri; la difficoltà principale in tale attività è data dal fatto che questo tipo di classificazione rappresenta un concetto nuovo per alcuni Stati membri mentre altri Paesi hanno gia` in uso un sistema più o meno differentemente strutturato per considerare e valutare la severità delle procedure sperimentali.

Alla luce di ciò FELASA (*European Federation Laboratory Animal Science Associations*) si è mossa con la creazione di due gruppi di lavoro che hanno come obiettivo l'emissione di linee guida per supportare e indirizzare l'interpretazione, applicazione e armonizzazione, delle nuove richieste legislative.

Questa relazione quindi vuole essere una riflessione sugli aspetti piu'innovativi e rilevanti della Nuova Direttiva per per gli aspetti relativi alla valutazione della severità delle procedure esperimentali.

Allo scopo di non creare confusione, ci è gradito precisare però che essendo un argomento relativamente nuovo nella realtà nazionale e soprattutto non ancora recepito dalla normativa

nazionale, l'interpretazione di tali argomenti cosi` come gli esempi forniti, corrispondono ad un`opinione personale degli autori, basata sulla nostra esperienza professionale e sulla nostra partecipazione ai gruppi di lavoro di FELASA sulla classificazione della severità delle procedure sperimentali e sulla valutazione retrospettiva di tale classificazione.

Classificazione della severità delle procedure

Attuale normativa italiana (DL.vo 27 gennaio 1992 n. 116)

L'attuale normativa italiana in vigore in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici prevede la classificzione delle procedure sperimentali in base alla loro severità nelle seguenti categorie:

1. Poca o nessuna sofferenza
2. Alcune sofferenze, di breve durata
3. Estreme e intollerabili sofferenze in animali coscienti
4. Forti privazioni, mutilazioni o altri traumi

Nell'applicazione pratica, però, tale classificazione presenta limiti evidenti quali l'assenza di una categoria che copra le procedure svolte in anestesia terminale,e il grande divario esistente tra il livello 2 "alcune sofferenze di breve durata" e il livello successivo "estreme e intollerabili sofferenze in animali coscienti" Ulteriormente a nostro parere i livelli 3 e 4 non hanno ragione di esistere alla luce del rispetto del principio delle 3R (Refinement, reduction and replacement) che prevede il refinement, cioè il miglioramento delle procedure sperimentali anche nell'ottica di una riduzione del dolore e della sofferenza potenzialmente indotte agli animali durante l'esecuzione delle procedure sperimentali.

Nuova Direttiva europea 2010/63/UE

La nuova Direttiva fornisce una classificazione più razionale della severità delle procedure, che nella nostra opinione permette di superare alcuni dei limiti dell'attuale legislazione nazionale. Anche in questo caso vengono identificate quattro categorie:

1. Non risveglio
2. Lieve
3. Moderata
4. Grave

Inoltre, l'Allegato VIII fornisce una descrizione di ogni categoria, insieme ad una lista di esempi (non esaustiva) per ognuna.

- *Non risveglio*
  Le procedure condotte interamente in anestesia generale da cui l'animale non può riprendere coscienza sono classificate come "non risveglio".
- *Lieve*
  Le procedure sugli animali che causano probabilmente dolore, sofferenza o angoscia lievi e di breve durata, nonché le procedure che non provocano un significativo deterioramento del benessere o delle condizioni generali degli animali sono classificate come "lievi".
  a. Somministrazione di anestesia, ad esclusione della somministrazione ai soli fini della soppressione.

b. Studio farmacocinetico, con somministrazione di dose unica, numero limitatori prelievi ematici (in totale < 10% del volume circolante) e sostanza che non dovrebbe causare effetti avversi riscontrabili.
c. Tecnica non invasiva per immagini (es. MRI) con opportuna sedazione o anestesia.
d. Procedure superficiali, es. biopsie di orecchio e coda, impianto sottocutaneo non chirurgico di minipompe o transponder.
e. Applicazione di dispositivi telemetrici esterni che causano solo lievi menomazioni o interferenze con l'attività e il comportamento normali.
f. Somministrazioni, per via sottocutanea, intramuscolare, intraperitoneale, mediante sonda ed endovenosa attraverso i vasi sanguigni superficiali, di sostanze con effetto lieve o nullo e in volumi nei limiti appropriati alla taglia e alla specie dell'animale.
g. Induzioni di tumori o tumori spontanei che non causano effetti clinici avversi riscontrabili (es. piccoli noduli sottocutanei non invasivi).
h. Riproduzione di animali geneticamente modificati da cui dovrebbe risultare un fenotipo con effetti lievi.
i. Alimentazione con diete modificate che non soddisfano tutte le esigenze nutrizionali degli animali e si prevede causino anomalie cliniche lievi nell'arco di tempo dello studio.
j. Confinamento di breve durata (<24 h) in gabbie metaboliche.
k. Studi che comportano la privazione di breve durata del partner sociale, la messa in gabbia di breve durata di ratti o topi adulti socievoli.

– *Moderata*

Le procedure sugli animali che causano probabilmente dolore, sofferenza o angoscia moderati e di breve durata, ovvero dolore, sofferenza o angoscia lievi e di lunga durata, nonche' le procedure che provocano probabilmente un deterioramento moderato del benessere o delle condizioni generali degli animali sono classificate come "moderate".

a. Applicazione frequente di sostanze di prova che producono effetti clinici moderati e prelievo di campioni ematici (>10% del volume circolante) in animali coscienti.
b. Studi per determinare i dosaggi che producono effetti acuti, test di tossicità cronica/ cancerogenicità con punti finali non letali.
c. Chirurgia in anestesia generale e somministrazione di idonei analgesici, associata a dolore, sofferenza o deterioramento delle condizioni generali post-chirurgici. Esempi: toracotomia, craniotomia, laparatomia, orchiectomia, linfadenectomia, tiroidectomia, chirurgia ortopedica con stabilizzazione efficace e trattamento delle lesioni, trapianto di organi con trattamento efficace dei rigetti, impianto chirurgico di cateteri o dispositivi biomedici (es. trasmettitori telemetrici, mini-pompe, ecc.).
d. Modelli di induzione di tumori o tumori spontanei che si prevede causino dolore o angoscia moderati o interferenza moderata con il comportamento normale.
e. Irradiazione o chemioterapia in dose altrimenti letale ma con ricostituzione del sistema immunitario. Gli effetti avversi previsti dovrebbero essere lievi o moderati e di breve durata (<5 giorni).
f. Riproduzione di animali geneticamente modificati da cui dovrebbe risultare un fenotipo con effetti moderati.
g. Creazione di animali geneticamente modificati mediante procedure chirurgiche.
h. Uso di gabbie metaboliche con restrizione moderata del movimento per un lungo periodo (fino a 5 giorni).
i. Studi con uso di diete modificate che non soddisfano tutte le esigenze nutrizionali degli animali e che si prevede causino anomalie cliniche moderate nell'arco di tempo dello studio.

j. Sospensione dell'alimentazione per < 48 ore nei ratti adulti.
k. Induzione della fuga e di reazioni di evitamento nei casi in cui l'animale è incapace di rispondere con la fuga o di sottrarsi agli stimoli, che si prevede causi angoscia moderata.

– *Grave*
Le procedure che causano probabilmente dolore, sofferenza o angoscia intensi, ovvero dolore, sofferenza o angoscia moderati e di lunga durata, nonche' le procedure che provocano probabilmente un deterioramento grave del benessere o delle condizioni degli animali sono classificate come "gravi".

a. Prove di tossicità in cui la morte è il punto finale, o si prevedono decessi accidentali e sono indotti stati patofisiologici gravi, es. prova di tossicità acuta con dose unica (cfr. orientamenti OCSE in materia di prove).
b. Prova di dispositivi che, in caso di guasti, pssono causare dolore o angoscia intensi o la morte dell'animale (es. dispositivi cardiaci).
c. Prova di potenza di vaccini caratterizzata da deterioramento persistente delle condizioni dell'animale, graduale malattia che porta alla morte, associata a dolore, angoscia o sofferenza moderati e di lunga durata.
d. Irradiazione o chemioterapia in dose letale senza ricostituzione del sistema immunitario, ovvero con ricostituzione e reazione immunologica contro l'ospite nel trapianto.
e. Modelli di induzione di tumori o tumori spontanei che si prevede causino malattia progressiva letale associata a dolore, sofferenza o angoscia moderati di lunga durata. Ad esempi, tumori che causano cachesia, tumori ossei invasivi, tumori metastatizzati e tumori che causano ulcerazioni.
f. Interventi chirurgici e di altro tipo in anestesia generale che si prevede causino dolore, sofferenza o angoscia postoperatoria intensi, oppure moderati e persistenti, ovvero deterioramento grave e persistente delle condizioni generali dell'animale. Produzione di frattura instabili, toracotomia senza somministrazionedi idonei analgesici ovvero traumi intensi a produrre insufficienza organiche multiple.
g. Trapianto di organi in cui il rigetto può causare angoscia intensa o deterioramento grave delle cndizione generali dell'animale (es. xenotrapianto).
h. Riproduzione di animali con alterazioni genetiche che si prevede causino deterioramento grave e persistente delle condizioni generali, es. morbo di Huntingdon, distrofia muscolare, neuriti croniche recidivante.
i. Uso di gabbie metaboliche con limitazione grave del movimento per un lungo periodo.
j. Scosse elettriche inevitabili (es. per indurre impotenza acquisita).
k. Isolamento completo di specie socievoli per lunghi periodi, es. cani e primati non umani.
l. Stress da immobilizzazione per indurre ulcere gastriche o insufficienza cardiache nei ratti.
m. Nuoto forzato o altri esercizi in cui il punto finale è l'esaurimento.

Gli esempi forniti possono essere utili nella valutazione di procedure standard, come quelle elencate, non sono però sicuramente esaustivi. In ragione di ciò il gruppo di lavoro FELASA sulla classificazione della severità delle procedure sperimentali ha identificato come uno dei sui obbiettivi principale, quello di fornire più esempi di procedure, focalizzandosi in particolare sulle fascie moderata e severa, e illustrando come l'applicazione di tecniche di miglioramento (*refinement*) possono avere un impatto positivo sul benessere degli animali (e conseguentemente sul livello di gravità assegnato alla procedura).

I legislatori, cosi` come i rappresentanti delle diverse associazioni professionali nazionali che partecipano ai gruppi di lavoro FELASA, concordano sulla necessità e importanza importanza di fornire una guida dettagliata ed effettiva all'interpretazione delle richieste legislative, ma allo stesso tempo sono consapevoli che un eccesso nell'elencare dettagliatamente le procedure o nel fornire esempi specifici potrebbe rivelarsi controproducente. Risulta quindi fondamentale la collaborazione e l'impegno di tutti gli utilizzatori di animali di laboratorio, nell'identificazione e assegnazione dei gradi de severità, cosi come nel loro monitoraggio durante il corso delle attività sperimentali.

Per assegnare la corrispondente categoria di severita ad una particolare procedura, si deve tenere conto di una serie di criteri elencati anche essi nell'Allegato VIII. Questi criteri possono essere suddivisi tra quelle relativi alla procedura stessa e altri fattori collegati all'animale, alle condizione di stabulazione o al disegno sperimentale.

Si elencano di seguito i criteri riportati nell'Allegato VIII:

1. Tipo di manipolazione, gestione.
2. Natura del dolore, della sofferenza, dell'angoscia o del danno prolungato causati dalla procedura (in tutti i suoi elementi) e relativa intensita', la durata, frequenza e molteplicità delle tecniche impiegate.
3. Sofferenza cumulativa nell'ambito della procedura.
4. Impedimento del comportamento naturale, dovuto tra l'altro a limitazioni delle norme in materia di alloggiamento, allevamento e cura.

Altri fattori non direttamente collegati con la procedura esperimentale e contemplati dalla Direttiva sono:

1. Tipo di specie e genotipo.
2. Maturità, età e sesso dell'animale.
3. Esperienza di addestramento dell'animale con riferimento alla procedura.
4. L'effettiva gravità delle procedure precedenti se l'animale è destinato a essere riutilizzato.
5. Metodi usati per ridurre o eliminare dolore, sofferenza, angoscia, tra cui il perfezionamento delle condizioni di alloggiamento, allevamento e cura
6. Endpoints umanitari.

Anche in questo caso, una maggiore chiarezza sulle modalità con cui questi criteri devono essere applicati sarebbe realmente auspicabile. In particolare, la corretta applicazione di end points umanitari e tecniche di miglioramento delle procedure stesse e delle condizioni generali di alloggiamento, possono avere un grande impatto sul benessere degli animali utilizzati in sperimentazione e di conseguenza contribuire ad una riduzione del grado di severità assegnato. Ugualmente l'assenza di tecniche di miglioramentodelle procedure e delle condizioni di stabulazione deve essere penalizzata, cioè giudicata negativamente in fase di revisione della documentazione relativa al progetto di ricerca e alle procedure sperimentali.

Ambito d'applicazione

Un aspetto di particolare importanza nella valutazione della severità delle procedure è rappresentato dal campo di applicazione di questa Direttiva e conseguentemente dalle definizioni fornite ovvero, quando possiamo considerare che un animale viene sottoposto a una procedura esperimentale. Ai sensi della Direttiva "procedura" viene definita come qualsiasi uso (a fini sperimentali o educativi) che possa causare all'animale un livello di dolore, sofferenza, angoscia o danno prolungato equivalente o superiore a quello provocato dall'inserimento di un ago. "Progetto" è un programma di lavoro con un preciso obiettivo scientifico che prevede il ricorso a una o più procedure. Da sottolineare che la Direttiva stabilisce che le categorie di

severità vengono assegnate alle procedure, anche se, gli esempi forniti nell'Allegato comprendono in alcuni casi chiaramente più di una procedura.

Quindi ai fini dell'assegnazione della corrispondente categoria di severità, possiamo intendere come procedura tutto quello che viene fatto a un animale per raggiungere l'obbiettivo scientifico (o educativo) stabilito nel protocollo sperimentale e, questo può comprendere un numero variabile di tecniche (intese come interventi o manipolazioni) sperimentali.

Secondo quanto indicato dalla Direttiva, l'assegnazione della categoria di severità è basata sugli effetti più gravi che sono potenzialmente "inflitti" al singolo animale, dopo che sono state applicate tutte le opportune tecniche di affinamento (*worse-case-scenario*). Fattori come il numero di animali utilizzati in un determinato progetto e/o procedura, la percentuale di animali che presentano eventuali effetti avversi e l'obiettivo finale del progetto, fanno parte del cosiddetto processo di analisi rischio-beneficio, ma non influiscono sull'assegnazione del grado di severità.

Inoltre, la Direttiva stabilisce che, fatta salva la clausola di salvaguardia (Articolo 55, paragrafo 3) non potranno essere effettuate quelle procedure che possano causare " dolore, sofferenza o angoscia intensi, che potrebbero protrarsi e non possano essere alleviati". Anche in questo caso, per garantire un criterio uniforme di applicazione, sarebbe utile un migliore definizione di cosa se intende per "dolore, sofferenza o angoscia intensi", forse accompagnato di qualche esempio specifico. Anche se ci sono un certo numero di modelli animali (es. nei campi delle malattie neurodegenerative o infettive) che per loro natura potrebbero rientrare in questa categoria resta difficile pensare ad un esempio nel quale il raggiungimento dell'obbiettivo scientifico stabilito precluda la possibilità di alleviari dolore, sofferenza o angoscia, sia tramite un miglioramento delle procedure, sia tramite definizione di end-points umanitari.

Applicazione pratica

La Direttiva non esplicita l'applicazione pratica delle categoria di severità, ma è evidente che essa, e di conseguenza i benefici per gli animali, passa per un seguimento accurato dalla fase sperimentale, e in particolare delle possibile deviazioni della severità prevista.

Anche se non espressamente indicato nella Direttiva, consideriamo la definizione degli effetti avversi associati ad ogni categoria come una parte fondamentale del concetto di "limiti di severità". Il concetto di limite di severitànon solo deve essere necessariamente applicato per confermare che effettivamente il livello di severità assegnato in modo prospettivo ad una determinata procedura, sia quello reale, ma risulta particolarmente importante in quei casi in cui la severità assegnata viene superata nel corso dell'esperimento (es. deterioramento delle condizioni cliniche degli animali a causa degli effetti inaspettati di un composto test durante un studio di farmacocinetica che per sua tipologia non prevede la comparsa di effetti avversi farmaco-correlati).

L'assenza di una descrizione degli effetti avversi associati ad ogni categoria di severità e, probabilmente, una scelta necesaria da parte dai legislatori, visto l`enorme varietà di procedure sperimentali attuabili, cosi` come le differenti tipologie di specie animali utilizzabilie di conseguenza la grande variabilità nei segni clinici che si possono osservare in seguito alle stesse.

La definizione di protocolli che raccolgano i segni clinici potenzialmente attesi per ogni livello di severità, cosi come le conseguenti azioni da intraprendere in caso il livello assegnato venga superato e possibilmente i punti finali umanitari (*early humane end-point*) non sono neanche nella nuova Direttiva una richiesta legislativa specifica, ma sicuramente una buona prassi, che può contribuire non poco a migliorare il benessere degli animali sottoposti a

procedure esperimentali. Questi approcci sono consigliabili soprattutto in quelli procedure di severità moderata e grave, dove un ritardo nell'intraprendere le opportune azione palliative, può sfociare in inutile dolore, sofferenza e angoscia per l'animale.

Per un'elaborazione completa, corretta e applicabile di questi protocolli risulta ovviamente indispensabile la partecipazione di tutto lo staff coinvolto nelle procedure sperimentali a partire dal medico veterinario, dai ricercatori, dai tecnici specializzati e, non ultimo, il personale addetto alla cura e mantenimento degli animali. Ciò favorisce una migliore integrazione di tutte le informazioni e delle conoscenze necessarie alla definizione di protocolli piùaccurati che garantiscano nel modo migliore il mantenimento dei limiti di severità previsti. È ulteriormente auspicabile il coinvolgimento dei Comitati Etici nella definizione di questi protocolli per garantire una consitenza nei criteri applicati tra i diversi gruppi di ricerca che lavorano nella stessa struttura.

Valutazione retrospettiva

Oltre all'assegnazione di categoria di severità in modo prospettivo, la Direttiva 2010/63 contiene la richiesta specificata negli Articoli 38 e 39 di decidere sull'opportunità di eseguire una valutazione retrospettiva dei progetti da parte dall'autorità competente in base alla documentazione necessaria presenta dagli utilizzatori. Quando questa valutazione viene fatta, deve contemplare diversi aspetti, tra i quali "il danno inflitto agli animali, compreso il numero e le specie di animali usati e la gravità delle procedure". Nello stesso Articolo 38, viene stabilito che gli Stati membri possono esentare i progetti che comportano unicamente procedure classificate come "lievi" o "non risveglio" dal requisito della valutazione mentre i progetti che comportano l'utilizzo di primati non umani e quelli che comportano procedure classificate come "gravi" sono sempre oggetto di valutazione retrospettiva.

L'obbiettivo di questa richiesta è sicuramente quella di migliorare le condizione di utilizzo degli animali tramite il ri-esame dei progetti piu'critici. Quest'approccio però pemette non solo il miglioramento del benessere degli animali utilizzati, ma anche della qualità della ricerca effettuata e una garanzia di apertura e trasparenza nei confronti dell'opinione pubblica.

D'altro canto la richiesta suppone comunque un incremento del carico di attività burocratiche per gli utilizzatori (in fase di raccolta e presentazione della documentazione necessaria) e per le autorità competenti (in fase di valutazione della documentazione ricevuta) che per non diventare eccessive dovranno essere adeguatamente coordinate e ottimizzate.

Conclusioni

Per concludere, consideriamo l'incorporazione della classificazione della severità delle procedure come un potente strumento per migliorare il benessere degli animali utilizzati per la ricerca. Per una corretta applicazione, sono necessari una stretta collaborazione tra tutto il personale coinvolto nelle attività sperimentali (ricercatori, veterinari, tecnici) e un supporto deciso e chiaro da parte del management delle istituzioni pubbliche e private coinvolte, allo scopo di dedicare il tempo le risorse necessarie al conseguimento di questo obiettivo.

Bibliografia di riferimento

Bonavia R, Jiménez A, Martí G, Riaño F, Visa J. Protocolo de supervisión y criterios de punto final en Oncología, aplicados en el Servei Estabulari del Institut D'Investigació Biomèdica de Bellvitge. *Animales de Laboratorio* 2010;48:15-9.

Casadesus A. Protocolos de supervisión y criterios de punto final en Farmacología-Toxicología. *Animales de Laboratorio* 2010;48:21-3.

Expert Working Group on severity classification of scientific procedures performed in animals. Final Report. Brussels, July 2009. Disponibile all'indirizzo: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/report_ewg.pdf; ultima consultazione 01/02/2012.

Laboratory Animal Science Association Working Party. Report. The assessment and control of the severity of scientific procedures on laboratory animals. *Laboratory Animals* 1990;24:97-130.

Morton DB and Griffiths PH. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Veterinary Record* 1985;116:431-6.

Solanes Foz D. Protocolo de supervisión y criterios de punto final en un modelo experimental para estudios en peste porcina africana utilizzando cepas altamente virulentas. *Animales de Laboratorio* 2010;48:27-30.

DIRETTIVA 2010/63 E IMPATTO SU ALLEVAMENTO E PRODUZIONE DEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Emanuele Cesana
Harlan Laboratories Srl, Udine

Sin dal 1986 la Comunità Europea ha adottato leggi specifiche per la protezione degli animali utilizzati per scopi scientifici. L'European Council of Ministers ha adottato la Direttiva 86/609/EEC per la "protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o altri scopi scientifici", con l'obiettivo di migliorare il controllo sull'uso degli animali e fissando standard minimi che riguardano: gli spazi necessari all'animale vivo, la formazione del personale coinvolto nel protocollo sperimentale, il controllo delle procedure. Non c'era però un formale mandato per il benessere degli animali.

Nel settembre 2010, con la Direttiva 2010/63/EU, viene aggiornata la Direttiva 86/609/EEC del 1986, per rafforzare la legislazione in materia di protezione degli animali che ancora sono necessari per la ricerca scientifica, concentrando l'attenzione sul benessere degli animali e riaffermando il principio delle 3Rs, *Replace-Reduce-Refine*, nella legislazione Europea.

Nonostante l'aspirazione sia quella di sostituire completamente l'utilizzo di animali vivi mediante tecniche alternative, la Direttiva riconosce che gli animali, compresi i Primati non Umani, sono oggi ancora fondamentali per la ricerca scientifica. Viene però riconosciuto il valore della vita e del benessere degli animali, valore che deve essere rispettato. L'Europa, assumendo una posizione importante nella ricerca e sviluppo di nuovi tests e tecnologie che non implichino l'uso degli animali, fissa anche gli standard minimi di *animal welfare*, standard che sono già pratica comune in molti Paesi della Comunità.

Per quanto riguarda l'allevamento, gli aspetti principali che toccano direttamente le aziende che allevano e forniscono animali da laboratorio sono:

- Tutte le autorizzazioni (allevamento-fornitura) saranno temporanee e il rinnovo soggetto ad ispezioni annuali.
- Dimensione delle gabbie e densità per gabbia.
- Animal care e formazione del personale.
- Metodi di eutanasia.
- Istituzione di un Animal Welfare Body, Comitato Etico, che assicuri l'implementazione della politica delle 3Rs.

L'Associazione degli Allevatori Europei di Animali da Laboratorio, FELABA - *Federation of European Laboratory Animals Breeders Associations*, rappresenta Società che stanno fornendo Animali da Laboratorio di alta qualità, specificamente allevati per la ricerca biomedica e veterinaria in Europa. Gli stabilimenti di allevamento sono presenti in sette Paesi della Comunità Europea e danno lavoro ad oltre 1500 persone. Per garantire il benessere degli animali e lo stato sanitario vengono utilizzate le più moderne tecnologie.

Gli Allevatori, che sempre operano nel massimo rispetto del benessere animale, pur condividendo gli obiettivi della Direttiva 2010/63/EU, non possono non esprimere dubbi per quanto riguarda i dettagliati standard stabiliti per le dimensioni delle gabbie, per altro non supportati da evidenze scientifiche che indichino un beneficio per il benessere degli animali. Gli standard proposti aumentano in modo molto significativo gli spazi richiesti per i riproduttori e lo stoccaggio dei ceppi comunemente utilizzati nel mondo scientifico, con la conseguenza che gli stabilimenti di produzione dovranno investire enormi capitali, l'intero CAPEX dei prossimi

anni, per l'espansione degli stabilimenti in modo da continuare a produrre gli stessi animali prodotti oggi.

Gli Allevatori di animali da laboratorio e la Comunità Scientifica sono interdipendenti. L'impatto economico sull'attività di allevamento avrà quindi pesanti ricadute su Università, Biotech, Industria Farmaceutica, CRO.

Opportuna è l'istituzione di comitati nazionali per la protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali od altri scopi scientifici, che forniscano consulenza alle Autorità competenti e agli organismi preposti al benessere degli animali, per promuovere i principi della sostituzione, della riduzione e del perfezionamento. Una rete di comitati nazionali dovrebbe contribuire allo scambio delle migliori pratiche all'interno dell'Unione. Nonostante gli Allevatori non possano contribuire al Replacement nei protocolli di ricerca, in quanto non direttamente coinvolti negli stessi, l'applicazione di Reducement e Refinement trova il nostro sostegno.

La Riduzione deve essere applicata nella gestione degli stoccaggi, una non corretta programmazione della produzione comporta un aumento non eticamente accettabile di animali in overstock. Va comunque tenuto conto che la Comunità Scientifica richiede un numero differente di animali maschi e femmine: per esempio gli studi sui ratti vengono generalmente eseguiti su soggetti maschi, al contrario gli studi sui topi vengono generalmente eseguiti su soggetti femmine. Questo genera un inevitabile surplus "biologico" al quale va aggiunto un surplus "di gestione" che dipende dalla periodicità delle richieste (minor numero di studi programmati durante il periodo delle vacanze), ristretto range di peso/età richiesto, comunicazione insufficiente, carenza di pianificazione.

Gli Allevatori e gli Utilizzatori collaborano per ridurre al minimo il surplus di produzione: migliorando la comunicazione circa le richieste di animali e i tempi, lavorando sulla pianificazione dei protocolli scientifici; implementando lo sviluppo di metodi alternativi; evitando la produzione di piccole colonie presso i centri ricerca; aumentando la collaborazione fra differenti centri; migliorando la registrazione dei dati della colonia per arrivare ad una più corretta gestione della stessa. Inoltre gli Allevatori hanno sviluppato tecniche, quali la criopreservazione, per evitare la produzione di animali la cui richiesta è infrequente.

Nonostante tutti gli sforzi, la produzione di surplus non può comunque essere azzerata. A questo proposito non possiamo dimenticare che anche gli animali che diventeranno surplus vengono mantenuti nelle migliori condizioni, con estrema attenzione al loro benessere. L'eutanasia, quando questo si rende necessario, viene compiuta secondo quanto previsto dalla legge. Va considerato che una parte significativa degli animali non richiesti per protocolli sperimentali non è comunque sprecata, ma viene utilizzata per prelevare organi o tessuti o fornita agli zoo, o allevatori di rettili e rapaci, come carcasse da utilizzare come alimento. Se questi ultimi non ricevessero dagli Allevatori, dovrebbero allevare roditori specificamente per questo scopo e probabilmente in condizioni meno controllate.

Intensa è anche l'azione di Refinement, assicurando in tutto il mondo la sovrapponibilità delle caratteristiche dei ceppi disponibili e contribuendo allo sviluppo di modelli specifici per le differenti linee di ricerca.

IMPATTO DELLA NUOVA DIRETTIVA EUROPEA SULLA SPERIMENTAZIONE TOSSICOLOGICA

Germano Oberto
RTC, Research Toxicology Centre SpA, Roma

La Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio dell'Unione Europea sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici sancisce che vertebrati vivi possono essere impiegati in sperimentazioni aventi come finalità "*la valutazione dell'innocuità dei farmaci, dei prodotti alimentari, dei mangimi e di altre sostanze e prodotti oppure la protezione dell'ambiente naturale, nell'interesse della salute o del benessere degli esseri umani o degli animali (art. 5)".* Sono questi gli obiettivi della sperimentazione tossicologica, che costituisce una parte consistente della cosiddetta "sperimentazione regolatoria", più volte menzionata dalla Direttiva e definita come *"la sperimentazione eseguita per fornire i dati relativi alla sicurezza per la salute umana e animale e per l'ambiente che la legislazione dell'Unione Europea richiede per l'immissione in commercio di sostanze e prodotti*".

Al riguardo la nuova Direttiva sancisce che, per evitare di penalizzare la ricerca e l'industria europea, la sperimentazione regolatoria deve essere agevolata grazie a processi di autorizzazione semplificati, considerando che si basa sulla ripetizione di determinate procedure condotte secondo metodiche prestabilite e definite da linee guida nazionali o internazionali. Tuttavia richiede grande impegno, da parte degli stati membri, per ridurre il numero di animali utilizzati in questa sperimentazione mediante lo sviluppo e la convalida di metodi alternativi, con conseguente abolizione di almeno alcune tipologie di procedure che prevedono l'uso di animali, e mediante applicazione di misure specifiche mirate ad evitare la ripetizione di sperimentazioni negli stati membri, con conseguente eliminazione dell'utilizzo inutile di animali.

Quanti animali e quali specie animali sono usati nella sperimentazione tossicologica in Europa?

I dati più aggiornati provengono dalla Sesta relazione sulle statistiche riguardanti il numero di animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici negli Stati membri, fornita dalla Commissione Europea a Parlamento Europeo e Consiglio nel dicembre 2010. Dalla relazione risulta che degli oltre 12 milioni di animali utilizzati annualmente, l'8,7%, vale a dire poco più di 1 milione, è stato impiegato per studi di tossicologia e valutazione della sicurezza. Di questi animali circa il 51 % sono stati usati per valutare prodotti da usare in medicina umana e veterinaria, il 7,1% per prodotti usati nell'industria, il 7,9 % per prodotti usati in agricoltura, mentre l'1,18% per la valutazione della sicurezza di additivi alimentari per consumo umano, cosmetici e prodotti destinati all'uso domestico. Inoltre, dalla relazione emerge che l'85% degli animali sono stati usati per condurre studi di valutazione della sicurezza richiesti da disposizioni legislative vigenti.

La sperimentazione è condotta in gran parte su mammiferi inclusi quelli con maggiore sviluppo neurologico. Infatti, la valutazione della sicurezza di farmaci per uso umano è richiesta sia su specie roditrici che non roditrici. I mammiferi non roditori più frequentemente impiegati sono cani e primati non umani a cui seguono maiali e conigli, queste ultime due specie sono usualmente richieste in sperimentazioni con finalità particolari e non possono completamente sostituire cani e primati non umani, pur riducendone l'utilizzo. La Sesta relazione sulle statistiche della Commissione Europea riporta che sul totale degli animali usati, quindi gli oltre

12 milioni, i primati non umani rappresentano lo 0,08%, i carnivori circa lo 0,3%, gli artiodattili (che includono i suini) circa l'1,4%.

Dopo queste considerazioni di carattere generale, cerchiamo di fare una valutazione dell'impatto della Direttiva 2010/63/UE sulla sperimentazione tossicologica, così com'è condotta attualmente in Italia e tuttora regolamentata dal Decreto legislativo 116/1992, decreto attuativo della Direttiva 86/609/CEE che è stata abrogata dalla nuova Direttiva europea.

Le norme sancite nei capi relativi alle "disposizioni generali", alle "procedure"e ai "requisiti degli utilizzatori" che appaiono molto dettagliate rispetto alla Direttiva precedente, e quindi all'attuale legislazione italiana, non comportano, variazioni di rilievo nelle modalità di cura e uso di animali in progetti di tossicità a fini regolatori. Sono, infatti, delle buone pratiche sperimentali che ormai sono in uso da anni nella sperimentazione tossicologica nel nostro Paese.

Nei decenni intercorsi tra l'entrata in vigore del DL.vo 116/1992 ad oggi, nell'ambito della sperimentazione tossicologica *in vivo*, c'è stato un notevole incremento della qualità, derivato non solo dall'accresciuta sensibilità pubblica nei confronti del benessere animale ma anche grazie alle Buone Pratiche di Laboratorio (BPL) e al processo di armonizzazione sui requisiti tecnici per la registrazione dei farmaci per uso umano, avvenuto negli anni '90 e conosciuto come ICH (*International Conference on Harmonisation*). La tossicologia è la branca di ricerca dove per prima è stata richiesta l'applicazione delle BPL e nonostante la qualità nella sperimentazione tossicologica fosse già elevata negli anni '90, il regolamento BPL ha richiesto un continuo innalzamento del suo livello con inevitabili effetti anche sulla cura e tutela degli animali impiegati.

Il processo di armonizzazione ICH nacque dalla necessità di uniformare le legislazioni a livello internazionale per evitare la duplicazione degli esperimenti, con conseguenti implicazioni economiche e anche etiche, in caso di esperimenti su animali. Il processo portò al riconoscimento internazionale di una serie di linee guida per la valutazione della sicurezza di farmaci che ha avuto sulla tutela degli animali un doppio effetto, da un lato ha eliminato la necessità di ripetizione di sperimentazioni con riduzione del numero di animali utilizzati e dall'altro ha sollecitato le industrie farmaceutiche ad armonizzare le norme sulla protezione degli animali, prendendo come riferimento le norme applicate dagli stati con più alto livello di qualità.

Alla sezione 3 del Capo IV, "Requisiti relativi ai progetti" troviamo le disposizioni sulla presentazione delle domande di autorizzazione dei progetti, sulla valutazione delle domande e sul rilascio delle autorizzazioni da parte dell'autorità competente. Anche su questo argomento le disposizioni sono molto dettagliate allo scopo di evitare le discrepanze tra regolamenti attuativi dei singoli stati, come avvenuto in passato, e armonizzare il livello di protezione degli animali negli stati membri.

Le norme che regolano il processo autorizzativo dei progetti anche se non innovative sono sicuramente più rigorose rispetto a quelle attualmente applicate in Italia.

Infatti, uno dei requisiti principali della domanda di autorizzazione è l'inserimento di una previsione della gravità delle procedure, previsione da effettuare secondo un criterio di classificazione ben definito. Informazioni sul grado di sofferenza indotto negli animali dalle procedure sono richieste e inserite nelle attuali domande di autorizzazione ma appare ovvio che, in base alla nuova Direttiva, le previsioni del livello di gravità delle procedure, acquistano una maggiore importanza nella valutazione del progetto, ma soprattutto divengono parametri fondamentali nella definizione dei controlli da effettuare sul progetto, una volta autorizzato. Per ridurre la soggettività intrinseca alla valutazione della gravità delle procedure la Direttiva riporta l'allegato VIII che classifica, con molti dettagli ed esempi, 4 categorie di gravità: "non risveglio", lieve, moderata e grave, classificazione che si base sul livello di dolore, sofferenza, angoscia o danno prolungato che le procedure sperimentali possono indurre in un animale.

In base a tale classificazione gli studi tossicologici possono rientrare in categoria di gravità variabile tra lieve a grave. La gravità lieve sarà da assegnare agli studi di breve durata, con somministrazioni singole o comunque di numero limitato, ed esposizione a sostanze che non determinano deterioramento delle condizioni generali dell'animale. La gravità moderata sarà da assegnare agli studi subacuti e cronici che richiedono un'applicazione frequente, spesso giornaliera, delle sostanze di prova, oppure ogni tipologia di studio dove possono verificarsi effetti clinici moderati e un deterioramento moderato del benessere e delle condizioni generali degli animali. Rientreranno, invece, nella categoria grave, gli studi in cui la sostanza di prova, dotata di tossicità, può provocare un grave deterioramento del benessere o delle condizioni generali degli animali, indipendentemente dalla durata dello studio, e sono possibili decessi accidentali o comunque l'insorgenza di stati patologici gravi anche se la morte non è prevista come esito finale.

Relativamente alla valutazione del progetto da parte dell'autorità competente, l'aspetto veramente innovativo della Direttiva è l'inserimento della valutazione retrospettiva, il cui scopo non è solo di verificare la conformità alle procedure autorizzative, ma anche il rispetto di quanto previsto dalla domanda di autorizzazione, come il livello di sofferenze inflitte agi animali, come il raggiungimento dell'obiettivo scientifico del progetto. La necessità di sottoporre un progetto a questo tipo di verifica sarà decisa nel corso del processo di valutazione, e il rilascio dell'autorizzazione sarà subordinato all'obbligo di revisione del progetto a scadenze definite in cui l'utilizzatore dovrà mettere a disposizione dell'autorità compente la documentazione da revisionare, relativa alla conduzione dello studio e ai risultati ottenuti. Potranno essere esentati dalla valutazione retrospettiva i progetti che richiedono solamente procedure classificate come lievi o non risveglio, mentre tutti i progetti in cui sono previste procedure classificate come gravi e in cui sono utilizzati primati non umani devono essere obbligatoriamente oggetto di valutazione retrospettiva. Ne consegue, che le sperimentazioni tossicologiche condotte su specie diverse da primati non umani in cui, in base alle caratteristiche della sostanza di prova o alla tipologia di sperimentazione, è prevedibile un deterioramento del benessere o delle condizioni generali di uno o più animali, dovranno essere oggetto di valutazione retrospettiva, così come tutte le sperimentazioni condotte su primati non umani indipendentemente dal livello di gravità delle procedure. L'intenzione della Direttiva è rendere la valutazione retrospettiva un utile strumento per favorire l'applicazione di test alternativi e il perfezionamento delle procedure sperimentali a vantaggio del benessere animale, per ridurre il numero di animali utilizzati e per evitare la duplicazione di esperimenti.

Attualmente in Italia, il rilascio delle autorizzazioni è subordinato all'obbligo di fornire al Ministero della Salute e all'Istituto Superiore di Sanità un rendiconto bimestrale dove sono specificate le procedure svolte sugli animali, il numero di animali utilizzati e il tipo di prodotto testato in ogni procedura. Le informazioni fornite alle autorità competenti con questo documento non sembrano essere sufficienti per una valutazione retrospettiva da effettuare con le modalità e le finalità definite dalla Direttiva.

Nell'ambito delle disposizioni relative al processo autorizzativo dei progetti, la Direttiva lascia libertà agli stati membri di adottare norme particolari per le sperimentazioni che devono soddisfare requisiti regolatori come la possibilità di rilasciare l'autorizzazione a progetti generici multipli realizzati dallo stesso utilizzatore oppure l'introduzione di un processo semplificato per i progetti che contengono procedure classificate come "non risveglio", "lievi" o "moderate" e non utilizzano primati non umani.

Quindi gli studi tossicologici regolatori rispondenti alle caratteristiche sopradette potrebbero usufruire di processi autorizzativi più snelli e rapidi, nonostante il processo di valutazione non preveda deroghe.

Con la nuova Direttiva sono date disposizioni sui tempi di decisione relativa all'autorizzazione, decisione che deve essere presa e comunicata non oltre 40 giorni lavorativi dal ricevimento della domanda. Solo se giustificato dalla complessità del progetto la decisione potrà essere prorogata una volta e per un periodo non superiore a 15 giorni lavorativi. Il tempo di decisione sancito è ben distante dai tempi, attualmente richiesti nel nostro Paese, per ottenere l'autorizzazione di un progetto, anche se richiesto dalle legislazioni vigenti.

Come già accennato in precedenza, la sperimentazione tossicologica regolatoria prevede l'uso di primati non umani per la valutazione della sicurezza dei farmaci per uso umano se risultano l'unica specie idonea per ottenere i dati necessari. L'impiego di primati non umani è un argomento a cui la Direttiva 2010/63/UE dedica ampio spazio, con disposizioni sul reclutamento degli animali, sulla finalità dei progetti che prevedono il loro uso, sui processi autorizzativi e sui controlli vincolanti il loro utilizzo. Tuttavia, non sembra imporre restrizioni particolari rispetto all'attuale loro impiego nella sperimentazione tossicologica mentre appare evidente l'intento di eliminare una delle principali deficienze della precedente Direttiva, 86/609/CEE, che non emanava norme specifiche e non imponeva particolari limitazioni nell'uso dei mammiferi più evoluti. Al riguardo il decreto attuativo italiano, DL.vo 116/1992, aveva già disposto norme più rigorose rispetto alla Direttiva europea mediante le disposizioni in deroga che interessano sia le specie in estinzione che cani, gatti e primati non umani. L'utilizzo di cani, gatti e primati non umani è vincolato al rilascio di decreto autorizzativo da parte del Ministero della Salute, in seguito a valutazione della finalità del progetto, necessariamente verifiche medico-biologiche essenziali, e a verifica che lo scopo del progetto non sia raggiungibile utilizzando altra specie.

La Direttiva 2010/63/UE subordina l'utilizzo di primati non umani nella sperimentazione tossicologica a particolari condizioni, come disposto all'articolo 8, "*che siano prove di innocuità di farmaci e prodotti mirati ad evitare, prevenire, diagnosticare o curare affezioni umane debilitanti o potenzialmente letali, inoltre quando scientificamente dimostrato che è impossibile raggiungere lo scopo utilizzando specie diverse*". Inoltre, specifica che un'affezione è da considerare debilitante quando riduce le normali funzioni fisiche o psichiche di una persona.

Confrontando le disposizioni della Direttiva con le disposizioni del DL.vo 116/1992 sulle finalità dei progetti tossicologici su primati non umani, emerge che la nuova Direttiva fornisce, alle autorità competenti, maggiori dettagli per la valutazione dei progetti contrapponendo le prove di innocuità di prodotti farmaceutici finalizzati alla prevenzione, diagnosi e cura di malattie umane debilitanti o potenzialmente letali alle generiche "*verifiche medico-biologiche essenziali*" indicate dal DL.vo 116/1992.

Come già specificato in precedenza, tutte le sperimentazioni su primati non umani sono oggetto, obbligatoriamente, di valutazione retrospettiva.

Relativamente ai primati non umani, l'aspetto più innovativo della Direttiva 2010/63/UE rimane l'obiettivo di eliminare la cattura degli animali selvatici a scopo di allevamento, per arrivare all'impiego dei soli primati discendenti da animali allevati in cattività o provenienti da colonie autosufficienti. Obiettivo finalizzato ad eliminare almeno stress e sofferenze, sicuramente molto elevati, che conseguono alla cattura, al trasporto, alla vita in cattività di un animale, oltretutto con esigenze comportamentali e sociali molto complesse, nato e vissuto allo stato selvatico.

Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma

Roma, ottobre-dicembre 2011 (n. 4) 29° Suppl.