



Comisia
Europeană

Îngrijirea animalelor în slujba unei științe de calitate

DIRECTIVA 2010/63/UE
PRIVIND PROTECTIA ANIMALELOR UTILIZATE
ÎN SCOPURI ȘTIINȚIFICE



**CADRUL DE EVALUARE
A SEVERITĂȚII**

Cuprins:

Document de lucru privind un cadru de evaluare a severității..... 1-18

Exemple pentru ilustrarea procesului de clasificare a severității, de evaluare20-78
zilnică și de evaluare a gradului real de severitate

**Autoritățile naționale competente pentru punerea în aplicare a
Directivei 2010/63/UE privind protecția animalelor utilizate în scopuri
științifice**

Document de lucru privind un cadru de evaluare a severității

Bruxelles, 11-12 iulie 2012

Comisia a stabilit un grup de experți (EWG) pentru evaluarea severității procedurilor cu scopul de a facilita punerea în aplicare a Directivei 2010/63/UE privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice. Toate statele membre și principalele organizații interesate au fost invitate să numească experți care să participe la lucrări.

Grupul de experți pentru evaluarea severității s-a reunit de două ori: în decembrie 2011, cu accent pe animalele modificate genetic și în mai 2012, pentru a discuta cu privire la un cadru general pentru evaluarea gradului real de severitate suportat de animale în cadrul procedurilor.

Prezentul document este rezultatul lucrărilor celor două reuniuni ale grupului de experți, al discuțiilor purtate cu statele membre, precum și al contribuțiilor juridice ale Comisiei privind abordarea unui cadru de evaluare a severității, componentele acestuia, participanții și instrumentele și metodele de lucru. Documentul a fost aprobat de autoritățile naționale competente pentru punerea în aplicare a Directivei 2010/63/UE în cadrul reuniunii acestora din 11-12 iulie 2012.

Declinarea responsabilității:

Următorul text este conceput ca un document de orientare menit să ofere asistență statelor membre și altor părți vizate de directivă pentru a se ajunge la o înțelegere comună a dispozițiilor cuprinse în directivă. Toate observațiile trebuie examinate în contextul Directivei 2010/63/UE privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice.

Numai Curtea de Justiție a Uniunii Europene are dreptul de a interpreta legislația UE cu autoritate juridică obligatorie.

Cuprins:

Articolele aferente din Directiva 2010/63/UE	3
Context general	3
Considerații generale pentru o evaluare a severității	4
Considerații pre-studiu	5
Indicatori de severitate	6
Categorii de nivel înalt	6
Factori care ar trebui avuți în vedere în evaluarea gradului real de severitate	7
Modul de asigurare a coerenței în evaluarea și atribuirea gradului real de severitate	9
Elaborarea unei fișe de evaluare specifice fiecărei proceduri	10
Coerența evaluării gradului real de severitate	10
Cine ar trebui să contribuie la evaluarea gradului real de severitate?	11
Instrumente de monitorizare, mijloace și alte considerații	12
Apendicele I - Glosar de observații clinice	13
Apendicele II - Bibliografie generală, orientări și resurse online privind evaluarea bunăstării animalelor supuse unor proceduri științifice	16

Articolele aferente din Directiva 2010/63/UE

- **articolul 4 alineatul (3)** „Statele membre iau măsuri în vederea perfecționării condițiilor de creștere, adăpostire și îngrijire, precum și a metodelor utilizate în cadrul procedurilor, prin eliminarea sau reducerea la minim a durerii, a suferinței, a stresului sau a vătămarilor de durată ce pot fi provocate animalelor.”
- **articolul 15 alineatul (1)** „Statele membre se asigură că procedurile sunt clasificate drept «fără recuperare», «superficiale», «moderate» sau «severe» în funcție de fiecare caz în parte, folosind criteriile de clasificare prevăzute în anexa VIII.”
- **articolul 16 alineatul (1) litera (d)** „[în reutilizarea acestuia] sunt respectate indicațiile veterinare, ținându-se seama de experiența de viață a animalului.”
- **articolul 54 alineatul (2)** „Statele membre colectează și fac publice, anual, informații statistice privind utilizarea animalelor în experimente, inclusiv informații privind severitatea experimentelor, precum și originea și speciile de primate neumane utilizate în proceduri. ...”

Context general

Directiva 2010/63/UE privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice prevede efectuarea unei evaluări prospective cu privire la severitatea fiecărei proceduri în cadrul unui proiect (articolul 15), precum și atribuirea unei clasificări a severității care poate fi „fără recuperare”, „superficială”, „moderată” sau „severă”. Anexa VIII oferă îndrumări privind factorii care trebuie luați în considerare în momentul analizării severității prospective și prezintă o serie de exemple pentru fiecare categorie de severitate.

Articolul 54 privind raportarea prevede că, pentru informațiile statice, trebuie raportat gradul real de severitate a durerii, a suferinței, a stresului sau a vătămarilor de durată suportat de animal (spre deosebire de evaluarea prospectivă, sau previziunile, cu privire la gradul de severitate realizate în momentul evaluării proiectului). În plus, gradul real de severitate a procedurilor anterioare va constitui un element cheie în stabilirea faptului dacă un animal poate fi refolosit în alte proceduri (articolul 16).

Astfel de măsuri oferă posibilitatea de a îmbunătăți calitatea științei și bunăstarea printr-o analiză prospectivă a propunerilor de proiecte și, prin includerea suferinței reale suportate de animal, acestea ar trebui să ofere un grad mai ridicat de transparență și de înțelegere a impactului procedurilor științifice asupra bunăstării animalelor.

Printre principalele avantaje ale evaluării prospective, ale monitorizării, ale evaluării și ale înregistrării gradului real de severitate se numără

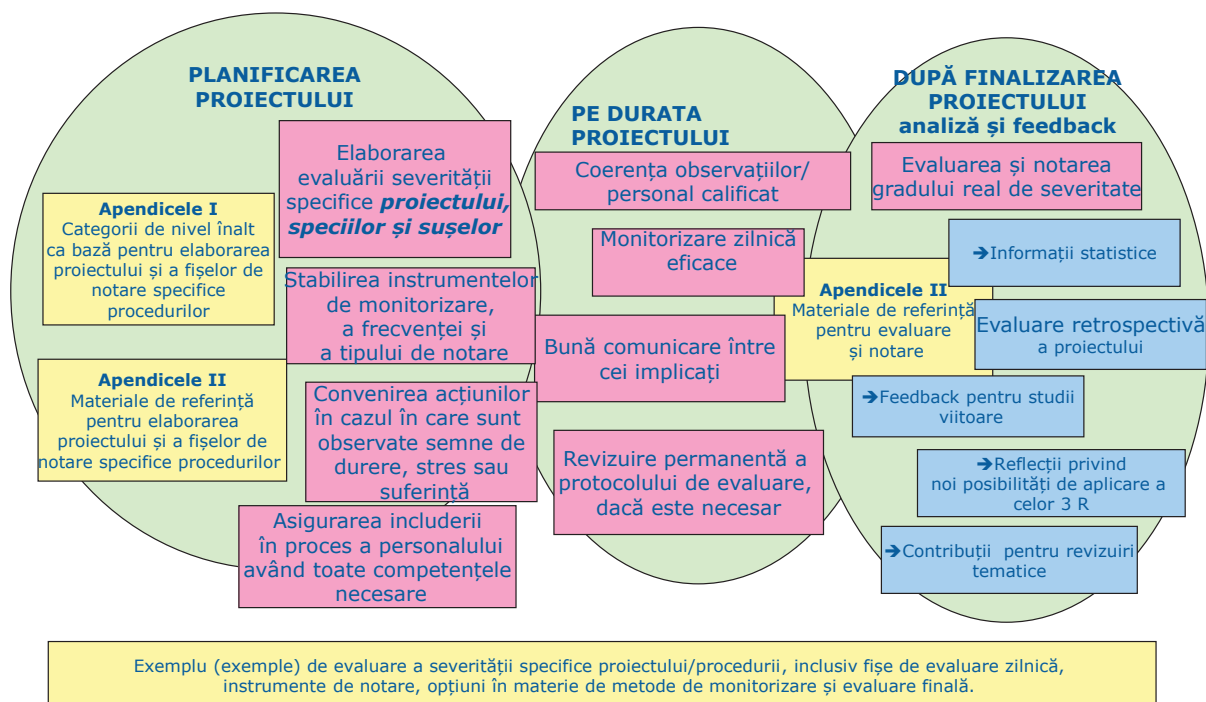
- în special, posibilitatea de a pune în aplicare îmbunătățiri („refinement”) și reducerea suferinței, deși discuțiile prospective vor oferi, de asemenea, posibilitatea de a examina dacă utilizarea animalelor este necesară („replacement” – înlocuire) și dacă studiul este adecvat, în vederea reducerii la minimum a utilizării animalelor („reduction” – reducere);
- îmbunătățirea bunăstării animalelor, de exemplu dacă suferința este recunoscută și ameliorată mai devreme;
- îmbunătățirea transparenței, întrucât statisticile ar trebui să reflecte mai bine costurile reale de bunăstare în ceea ce privește animalele;

- o mai bună comunicare între responsabilii cu utilizarea, îngrijirea și monitorizarea animalelor;
- contribuția la evaluarea retrospectivă a proiectelor, atunci când aceasta este efectuată (articolul 39);
- îmbunătățirea calității datelor științifice ca urmare a ameliorării bunăstării;
- dezvoltarea cunoștințelor cu privire la evaluarea severității și a semnelor clinice, care vor promova o mai mare coerență a evaluărilor – cu condiția difuzării abordărilor și a rezultatelor, de exemplu, prin intermediul revistelor, al grupurilor de discuții și al reuniunilor;
- contribuția la cursurile de formare pentru cercetători, tehnicieni veterinari și medici veterinari pentru animale de laborator, în cazul în care rezultatele sunt folosite pentru a oferi exemple;
- informații documentate care pot fi utilizate în evaluările privind raportul prejudicii-beneficii pentru viitoare proiecte similare.

Considerații generale pentru o evaluare a severității

Examinarea severității în cadrul unei proceduri ar trebui să constituie un **proces continuu** începând cu elaborarea inițială a studiului, pe parcursul monitorizării zilnice specifice studiului a animalelor pe durata proiectului și până la evaluarea gradului „real” de severitate la încheierea studiului, care oferă posibilitatea de a identifica îmbunătățiri suplimentare pentru studiile viitoare.

EVALUAREA SEVERITĂȚII- UN PROCES CONTINUU



Printr-o astfel de abordare cresc posibilitățile de asigurare a faptului că cei 3 R (replacement, reduction, refinement – înlocuire, reducere, îmbunătățire) sunt avuți în vedere și puși în aplicare pe parcurs, că procesul de comunicare între părțile implicate va fi îmbunătățit și că va fi consolidată coerența.

Evaluarea efectivă a severității necesită

- o abordare „de echipă”, cu contribuții din partea persoanelor cu expertiză, experiențe și priorități diferite, de exemplu, cercetători, tehnicieni veterinari și personal de îngrijire, medicul veterinar;
- o bună planificare;
- o educație și formare continuă adecvate pentru întreg personalul implicat;
- sisteme de evaluare zilnică a severității care sunt adaptate în mod corespunzător în funcție de specie, sușă și proiect, inclusiv observații documentate și structurate referitoare la animale la intervale corespunzătoare (de exemplu, cu o frecvență crescută în timpul și după finalizarea procedurilor);
- protocoale bine documentate și eficiente pentru evaluarea comportamentului și a semnelor clinice;
- analiza observațiilor în vederea formulării unei decizii în cunoștință de cauză cu privire la natura și nivelul suferinței;
- conștientizarea gradului de severitate a fiecărei proceduri și a acțiunilor care trebuie întreprinse dacă acesta este atins sau depășit;
- o abordare coerentă a tuturor deciziilor globale referitoare la suferința reală (superficială, moderată, severă) pentru raportarea statistică;
- reflecții asupra eficienței aplicării celor 3 R și asupra posibilității de a realiza îmbunătățiri pentru studiile viitoare.

Considerații pre-studiu

Procesul de asigurare a faptului că severitatea este redusă la minimum în timpul procedurilor științifice începe din **etapa de concepere**, atunci când se analizează dacă este necesar și justificat să se folosească animale vii pentru a îndeplini obiective științifice.

- În cazul în care utilizarea animalelor vii este necesară și justificată, este important să se asigure faptul că s-a ales un model adecvat și că studiul se bazează pe un concept solid;
- Toate aspectele studiului care pot cauza durere, suferință, stres sau vătămare de durată trebuie identificate și trebuie avut în vedere modul în care efectele acestora pot fi reduse la minimum, de exemplu prin consultarea literaturii de specialitate, a colegilor, a tehnicienilor veterinari, a medicilor veterinari și a organismului pentru bunăstarea animalelor, dacă este cazul;
- Clasificarea prospectivă recomandată a severității atribuită procedurilor ar trebui să se bazeze pe cel mai ridicat grad de severitate anticipat pentru orice animal inclus în studiu;
- Ar trebuie elaborat un plan de observare a animalelor care să fie adecvat și adaptat studiului. O terminologie standardizată care poate fi înțeleasă de către toți cei implicați în studiu va îmbunătăți coerența în materie de raportare și de interpretare;
- Este important să se asigure că există suficient personal competent și instruit disponibil pentru realizarea studiului, care să monitorizeze și să îngrijească animalele.

Indicatori de severitate

Există comportamente și semne clinice care pot fi utilizate pentru a evalua severitatea procedurilor „la nivelul cuștii” (sau al bazinului, țarcului etc.). Terminologia utilizată pentru descrierea acestora ar trebui să poată fi înțeleasă de către toți cei implicați în utilizarea, monitorizarea și îngrijirea animalelor. Pentru orice sistem de evaluare a severității, este esențială o înțelegere profundă a stării normale de sănătate, de comportament și de bunăstare a speciei (a sușei, dacă este cazul) care face obiectul observării.

Obiectivul ar trebui să fie de:

- atingere a celui mai bun grad posibil de calitate a vieții pentru animal;
- asigurare a faptului că orice formă de suferință cauzată de procedurile științifice este recunoscută și
- redusă la minimum, dar cu menținerea coerenței cu obiectivele științifice.

Orice sistem de evaluare ar trebui să identifice în mod eficace orice abatere de la starea normală de sănătate și bunăstare, permițând observatorului să înregistreze și să transmită o evaluare clară și coerentă pentru fiecare animal.

O abordare simplă, ierarhică poate fi folosită pentru a defini un protocol de evaluare a severității care să fie adaptat în mod corespunzător în funcție de specie, sușă, indivizi și procedură. Procesul de definire a unui protocol de evaluare la nivelul cuștii ar trebui să identifice toate efectele adverse care pot apărea pe durata experienței de viață a animalului, inclusiv adăpostirea, creșterea, îngrijirea și manipularea, precum și efectele adverse cauzate de procedurile științifice și consecințele acestora. Analiza tuturor efectelor adverse ar trebui să conducă la identificarea unor indicatori care să poată fi utilizați pentru evaluarea eficace a bunăstării animalului la nivelul cuștii. Indicatorii ar trebui să fie adaptați în funcție de specie, sușă și procedurile experimentale aplicate. Aceștia ar trebui să fie ușor de înțeles, de identificat și de înregistrat în mod consecvent. Cu toate acestea, este important să se asigure că există, de asemenea, posibilitatea de a capta și a înregistra eventualele efecte adverse neprevăzute, de exemplu, sub formă de text liber.

Categorii de nivel înalt

Un set de categorii globale, „de nivel înalt”, care se aplică pentru toate speciile este prezentat în cele ce urmează ca punct de plecare pentru elaborarea unei liste exhaustive de indicatori specifici pentru fiecare procedură sau program de îngrijire a animalelor. Scopul este de a realiza pentru fiecare studiu o listă specifică conținând un număr suficient de indicatori pentru a reduce la minimum riscul de a nu depista semne de suferință, fără a concepe un sistem mult prea complex care ar fi inefficient de birocratic și consumator de timp.

Categoriile de nivel înalt sunt:

- aspect
- funcții fiziologice
- mediu
- comportamente
- indicatori specifici procedurii
- observații libere (alte observații relevante)

Indicatorii din cadrul fiecărei categorii pot fi adaptați la oricare specie. Aceștia ar trebui folosiți pentru a realiza o listă de caracteristici observabile care pot fi evaluate de către o persoană instruită în mod adecvat în vederea formulării unei decizii cu privire la starea de sănătate și de bunăstare a animalului.

Indicatorii ar trebui discutați și selectați în colaborare cu persoana (persoanele) responsabilă (responsabile) cu supravegherea bunăstării animalelor și cu organismul pentru bunăstarea animalelor, dacă este cazul. Ulterior, indicatorii ar trebui folosiți pentru dezvoltarea de sisteme de evidență a datelor privind animalele la nivelul cuștii, specifice studiului, pentru observare zilnică, monitorizare și evaluare.

Apendicele I oferă un exemplu privind modul în care categoriile de nivel înalt pot fi subdivizate în continuare și utilizate pentru a dezvolta criterii observaționale adecvate, folosind o terminologie descriptivă comună.

Apendicele II oferă informații privind orientările și resursele online care pot contribui la dezvoltarea unor evaluări adecvate ale bunăstării în cazul animalelor supuse unor proceduri științifice.

Factori care ar trebui avuți în vedere în evaluarea gradului real de severitate

Trebuie notat faptul că, în funcție de situațiile specifice, o serie de elemente pot avea un impact pozitiv sau negativ asupra gradului de severitate, iar diferențele dintre specii trebuie luate în considerare.

Evaluarea gradului real de severitate ar trebui efectuată pentru fiecare caz individual în parte, folosindu-se observațiile cu privire la animale realizate pe durata monitorizării zilnice. De asemenea, pot fi utilizați parametri adiționali necesari în scopul studiului, dacă este cazul și dacă aceștia sunt disponibili. De exemplu, indicatori care nu pot fi observați (precum temperatura corpului, greutatea corporală, parametri biochimici sau date biotelemetrice precum ritmul cardiac) ar putea fi, de asemenea, necesari pentru studiu și ar trebui luați în considerare în evaluarea severității dacă aceștia pot furniza informații adiționale relevante.

Gradul real de severitate raportat pentru fiecare animal în parte ar trebui să fie gradul cel mai ridicat suportat pe durata procedurii și nu să se bazeze pe severitatea înregistrată la finalizarea procedurii. De asemenea, evaluarea nu ar trebui considerată un simplu proces de adiție, de exemplu, un număr de proceduri superficiale = severitate moderată. Aceasta ar trebui să se bazeze pe o evaluare globală a experienței animalului de la începutul procedurii și până la finalizarea acesteia.

Lista de mai jos oferă exemple cu privire la tipul de elemente care ar trebui avute în vedere și analizate în momentul evaluării gradului real de severitate.

Procedură, tehnică

- chirurgicală/nechirurgicală;
- nivelul și durata imobilizării;
- neutilizarea analgezicelor/anesteziei atunci când unele sau ambele ar fi necesare;
- model sau procedură nouă;
- elemente de mediu (inclusiv adăpostirea și restricții privind hrana/apa);
- stres/suferință;
- proceduri repetate și intervalele dintre acestea (de asemenea, trebuie luate în calcul frecvența și combinarea intervențiilor „sub prag”);

- reutilizare sau utilizare continuă.

Specie, sușă, stadiu de dezvoltare, experiență anterioară

- **Acesta ar trebui să reprezinte un considerent principal – este necesară înțelegerea biologiei și a comportamentului speciei și ale sușei (și uneori ale individului) pentru a putea face previziuni și a evalua în mod eficient gradul de severitate;**
- **specie și sușă;**
- originea animalului, de exemplu, crescut în anumite scopuri, nedomesticit sau sălbatic;
- proveniență (inclusiv condițiile de adăpostire anterioare) și transport;
- genotip, fenotip, sex, vârstă, starea imunitară;
- comportamentul natural și biologia (de exemplu, importanța relativă a diferitelor simțuri, cum ar fi vederea pentru primate și mirosul pentru rozătoare, și modul în care acestea pot fi afectate în mediul de laborator);
- adăpostire individuală/în grup – justificare pentru a adăposti individual animale sociale sau a le separa de grupuri stabile pe termen scurt sau lung;
- ritmuri diurne, de exemplu, impactul derulării de proceduri științifice sau de creștere asupra animalelor nocturne pe lumină;
- separare maternă la toate speciile, inclusiv rozătoare;
- abilități cognitive, conștientizare, memorie, perceperea efectelor procedurilor.

Frecvență, intensitate

- Nu există o legătură directă între frecvență și severitate, și anume, o frecvență crescută nu are în mod necesar drept rezultat un grad mai ridicat de severitate. Aceasta se datorează faptului că efectul asupra severității al procedurilor sau tehnicilor repetate depinde de un număr de factori precum intensitatea fiecărei intervenții, durata acesteia, specia și experiența fiecărui animal;
- Atunci când intervențiile sunt repetate, există un potențial de adaptare, care poate reduce severitatea, de exemplu la un primat non-uman supus unor proceduri superficiale. Pe de altă parte, repetiția poate crește severitatea, de exemplu ca urmare a anticipării unei proceduri stresante sau a declanșarea hiperalgeziei dacă este implicată o procedură chirurgicală;
- Potențialul pentru formarea consolidării pozitive sau „recompense” ulterior procedurilor;
- Ar trebui înregistrat cel mai înalt nivel de severitate în locul severității aferente „nivelului de recuperare”.

Durata efectului

- Durata este *legată* de intensitate (și, prin urmare, de severitate);
- Dacă este posibilă utilizarea de puncte finale timpurii umanizate sau științifice.

Eficacitatea îmbunătățirilor

- analgezie, anestezie și îngrijire post-operatorie adecvată;
- îmbogățirea mediului de viață – îmbogățirea atât a mediului, cât și a adăpostirii în grup a animalelor sociale;
- adăpostire, creștere și îngrijire – dacă este posibilă îmbunătățirea acestora în conformitate cu cele mai bune practici actuale sau dacă procedura necesită restricții precum închidere în incinte mai mici (de exemplu, cuști metabolice), podea sub formă de grilaj sau expunere la condiții de mediu care ar putea cauza stres;
- dresarea animalului pentru încurajarea cooperării sau facilitarea obișnuirii acestuia cu procedurile;
- eficacitatea protocoalelor de evaluare la nivelul cuștii.

Severitate cumulativă

- Întreaga experiență de viață a fiecărui animal, în contextul căreia restricțiile impuse capacității de îmbunătățire a adăpostirii sau necesitatea capturării frecvente, transferul și reținerea etc. pot afecta severitatea, trebuie luată în considerare în cadrul unei proceduri care implică o serie de etape/ intervenții;
- proceduri anterioare, în cazul reutilizării;
- Experiența de viață, inclusiv elemente precum proveniența (de exemplu „înțarcare” timpurie) și transport, trebuie luată în considerare în momentul analizării reutilizării.

Modul de asigurare a coerenței în evaluarea și atribuirea gradului real de severitate

Contribuțiile în etapa de concepere a studiului din partea oamenilor de știință, a tehnicienilor veterinari, a medicilor veterinari și a personalului de îngrijire relevant sunt necesare, în general, pentru a asigura faptul că există suficiente date adecvate disponibile pentru a permite luarea unei decizii documentate cu privire la gradul real de severitate la sfârșitul procedurii. Clasificarea finală a gradului real de severitate va fi rezultatul unei analize a înregistrărilor observațiilor făcute la nivelul cuștii cu privire la comportament, semne clinice și alți parametri relevanți.

Printre elementele care contribuie la asigurarea coerenței se numără:

- încorporarea unor expertize, experiențe și priorități multiple – o abordare „în echipă”;
- formare cu privire la utilizarea protocolului de evaluare zilnică (inclusiv terminologia comună utilizată pentru descrierea observațiilor);
- experiența în materie de sănătate animală, bunăstare și comportament;
- revizuirea regulată a rezultatelor;
- comunicarea între toți responsabilii cu efectuarea studiului și monitorizarea animalelor (ascendent, descendent, între și în cadrul);
- supraveghere [la nivel local (de exemplu, organismul pentru bunăstarea animalelor), regional, național, UE].

Următoarele aspecte cheie ar trebui avute în vedere pentru asigurarea coerenței în evaluarea gradului real de severitate:

Elaborarea unei fișe de evaluare specifice fiecărei proceduri

- Fișele de evaluare adaptate în funcție de specie, sușă și studiu ar trebui elaborate și convenite înainte de începerea proiectului;
- Toate informațiile relevante disponibile ar trebui utilizate în mod efectiv în elaborarea fișelor de evaluare specifice fiecărui proiect, de exemplu experiența anterioară, rezultatele studiilor *in vitro* sau *in silico*, date din literatura de specialitate, informații din studii pilot și semne clinice observate la oameni sau la alte animale;
- Informațiile privind parametrii care trebuie observați și modul în care ar trebui efectuată monitorizarea ar trebui să fie disponibile pentru evaluarea la nivelul costii;
- Clasificarea prospectivă a gradului de severitate va „dicta” parțial nivelul de implicare necesar la nivel operațional, dacă este necesară o abordare în echipă pe durata monitorizării și cine ar trebui implicat în realizarea observațiilor efective și în procesul de înregistrare. Cei care au elaborat protocolul de evaluare specific studiului ar trebui să efectueze și/sau să confirme clasificarea finală a gradului real de severitate;
- În funcție de complexitatea studiului, ar putea fi utile fișe de evaluare separate pentru componente separate, de exemplu o fișă de îngrijire standard chirurgicală/perioperatorie utilizată în combinație cu protocolul de evaluare adaptat studiului;
- În unele cazuri, ar putea fi necesar ca fișele de evaluare specifice studiului să includă informații relevante pentru gestionarea coloniilor, de exemplu, date privind reproducerea și creșterea animalelor modificate genetic.

Coerența evaluării gradului real de severitate

Evaluarea gradului real de severitate este realizată la sfârșitul procedurii și presupune luarea unei decizii referitoare la severitatea globală suportată în mod real de către animal, pe baza evaluărilor zilnice și ținând seama de procedurile care au fost efectuate.

- O abordare folosită în mod curent constă în definirea nivelurilor „superficial”, „moderat” sau „sever” pentru fiecare dintre indicatorii folosiți în evaluările zilnice și ulterior formularea unei decizii cu privire la severitatea acestora pentru fiecare caz în parte;
- **Precum în cazul monitorizării zilnice, este esențial ca toate criteriile reale de evaluare să fie adaptate în funcție de procedură, specie și sușă;** de exemplu, o pierdere în greutate de 10 % va avea implicații foarte diferite pentru sănătate și bunăstare în cazul unui șobolan tânăr, în creștere, al unui șoarece adult cu o tumoră cu extindere rapidă sau al unui câine adult;
- Luarea în considerare a perioadei de timp în care apar unii dintre indicatori este, de asemenea, un factor esențial, în special în ceea ce privește pierderea în greutate și consumul de hrană/apă.

Evaluarea se va realiza folosindu-se înregistrările din evaluarea zilnică, ținând seama de procedura la care este supus animalul, modul în care au persistat efectele adverse de durată și dacă animalul a fost refolosit. Deși, în mod inevitabil, acest lucru va implica un

anumit grad de subiectivitate, formarea adecvată a observatorului ar trebui să vizeze reducerea subiectivității.

Clasificarea gradului real de severitate în cazul în care animalele sunt găsite moarte

- În cazul în care un animal este găsit mort, și anume, acesta nu a fost sacrificat, aceasta poate reprezenta o consecință fie a procedurii experimentale, fie a altor cauze independente¹;
- Gradul real de severitate pentru animalele găsite moarte ar trebui raportat ca fiind „sever”, cu excepția cazului când poate fi luată o hotărâre documentată cu privire la faptul că animalul nu a suportat o suferință severă înainte de deces;
- Dacă este improbabil ca decesul să fi fost precedat de o suferință severă, clasificarea gradului real de severitate ar trebui să reflecte experiența cunoscută anterior decesului. O atenție deosebită trebuie acordată factorilor precum frecvența monitorizării, utilizarea de analgezice etc.;
- „vătămarea (de durată)” poate fi suportată doar de un animal viu.

Ar trebui elaborate exemple pentru a ilustra procesul de clasificare a gradului de severitate, monitorizare zilnică, evaluare finală a gradului real de severitate, iar acestea ar trebui puse la dispoziția comunității științifice.

Cine ar trebui să contribuie la evaluarea gradului real de severitate?

- Observarea și înregistrarea efectelor sunt deseori procese separate de clasificarea gradului real de severitate;
- Ar trebui stabilite responsabilități clare pentru a asigura monitorizarea zilnică efectivă a animalelor, cu sprijinul și supravegherea corespunzătoare;
- Ar trebui instituit un proces de verificare pentru a promova coerența, de exemplu, prin compararea punctajelor de evaluare acordate de diferite persoane;
- Rolurile cu privire la observarea și monitorizarea animalelor și la efectuarea evaluărilor gradului real de severitate ar trebui să fie flexibile și ajustabile pe baza complexității și a severității studiului în cauză – deși responsabilitatea juridică pentru asigurarea depistării și a reducerii la minimum a suferinței revine în continuare persoanei numite în autorizarea proiectului;
- Organismele pentru bunăstarea animalelor ar trebui, de asemenea, să joace un rol la nivel de unitate pentru a asigura coerența;
- Comitetele naționale și autoritățile competente ar putea contribui, de asemenea, la promovarea coerenței.

¹ În scopul raportării statistice, gradul real de severitate ar trebui să fie legat, în principal, de severitatea procedurilor experimentale și nu de incidente independente precum declanșarea unor boli sau inundarea cuștii. Aceste tipuri de accidente se referă la probleme de sănătate sau la practici de creștere și de îngrijire și nu la vătămări datorate procedurilor; cu toate acestea, ele ar trebui înregistrate, investigate în detaliu și monitorizate pentru a preveni reapariția acestora.

Instrumente de monitorizare, mijloace și alte considerații

- Utilizarea fișelor de notare ar trebui avută în vedere în etapa de planificare a proiectului;
- Fișele de notare ar trebui să fie cât mai simple posibil, dar suficient de detaliate și adaptate tipului de studiu;
- Fișele de evaluare elaborate anterior pot fi folosite dacă acestea sunt adecvate studiului, speciei și sușei;
- Sistemele electronice de menținere a evidenței pot contribui la asigurarea coerenței și la facilitarea accesului la toate informațiile relevante;
- Este recomandată utilizarea unui limbaj și a unei terminologii standardizate;
- Datele înregistrate ar trebui să fie cât mai obiective posibil;
- Avantajele și dezavantajele sistemelor de (i) notare numerică și (ii) de observare „binară” (în cazul în care indicatorii sunt marcați ca „prezenți” sau „absenți”) ar trebui analizate de la caz la caz;
- Toate tipurile de înregistrare a observațiilor ar trebui să includă posibilitatea de a adăuga text liber, precum și indicatori predeterminați astfel încât să poată fi înregistrare observațiile neașteptate;
- Este esențială formarea efectivă a întregului personal relevant pentru a acoperi în mod specific evaluarea severității și a bunăstării, precum și tehnicile de monitorizare;
- Ar trebui stabilit un plan de comunicare care să cuprindă întreg personalul relevant; acesta ar trebui să includă un mecanism de comunicare rapidă a rezultatelor neașteptate către toate persoanele adecvate, și dacă este cazul, către autoritatea competentă;
- Monitorizarea ar trebui să fie proporțională cu efectele anticipate – procedurile care pot cauza suferință „severă” vor necesita, în general, o monitorizare mai frecventă și mai detaliată;
- Ar trebui să existe criterii clare pentru intervenție, de exemplu, dacă sunt observați parametri particulari sau dacă se atinge un nivel predeterminat de suferință. Întreg personalul relevant ar trebui să cunoască respectivele criterii, modul în care trebuie să acționeze și persoanele pe care trebuie să le contacteze în cazul în care acestea apar.

Dacă procesul de evaluare a severității este pus în aplicare în mod efectiv, animalele și întreg personalul implicat în îngrijirea și utilizarea acestora vor beneficia de un grad mai ridicat de bunăstare a animalelor, de validitate științifică și de transparență. O bună comunicare internă și externă cu privire la procesul de evaluare a severității și la punerea în aplicare a celor 3 R va genera avantaje chiar mai ample.

Apendicele I Glosar de observații clinice

Succesul oricărei scheme de evaluare a severității depinde de selecția unor indicatori privind bunăstarea care:

- să poată fi recunoscuți imediat și în mod fiabil;
- să fie eficienți în furnizarea unor măsuri bune privind bunăstarea;
- să fie relevanți pentru studiul științific, specie și sușă (dacă este cazul);
- să fie practici în ceea ce privește punerea în aplicare și să nu deranjeze în mod excesiv animalul și
- să poată fi măsurați, interpretați și analizați în mod coerent.

Prin urmare, este de dorit să se adopte o abordare comună cu privire la înregistrarea observațiilor clinice, întrucât acest lucru va contribui la dezvoltarea unor abordări coerente cu privire la clasificarea severității. Aceasta ar facilita comparații ale constatărilor clinice ale diferitelor studii și ar informa persoanele implicate în evaluarea severității.

Observațiile sunt structurate în următoarele șase categorii de nivel înalt:

Aspect / Funcții fiziologice / Mediu / Comportamente / Indicatori specifici procedurii / Observații libere

Categorii de nivel înalt	Aspecte vizate în momentul observării animalelor	Indicatori specifici de monitorizat
Aspect	Condiția corporală	Pierderea/luarea în greutate
		Obez
		Slab
		Condiția corporală a animalului, dacă este disponibilă
	Starea blănii și a pielii	Pilozitate
		Neîngrijit/nearanjat

		Blană unsuroasă
		Năpârlire
		Deshidratare – încrețirea pielii
		Leziuni ale pielii – umflături; cruste; ulcer; rană/plagă
		Colorarea fecalelor sau a urinei
	Mucoase	Oculare; nazale; uro-genitale; colorarea porfirinei la unele specii, de exemplu la șobolan
	Ochi	Adânciți sau „teșiți”
		Închiși/semi-închiși
		Afecțiune/rană a ochiului (de exemplu, ulcerare corneană)
	Gură	Salivare
		Malocluzie/dinți crescuți excesiv
	Altele	„Expresie facială a durerii” – de exemplu, ochi semi-închiși și o protuberanță la nivelul nasului la șoareci
		Crampe abdominale
O parte a corpului umflată, de exemplu abdomen umflat		
Funcții fiziologice	Respirație	Respirație accelerată (tahipnee)
		Respirație dificilă (hiperpnee)
		Respirație foarte dificilă (dispnee)
		Șuierături sau alte sunete în momentul respirației
	Consumul de hrană/apă	Crescut/scăzut
	Temperatura corpului	Crescută/scăzută; temperatura corpului măsurată, dacă aceasta este disponibilă (de exemplu, prin intermediul unui microcip sau dispozitiv de telemetrie, termometru cu sau fără contact); culoarea extremităților la rozătoare
	Simțuri	Probleme de văz, auz sau echilibru
Mediu	Mediul din incintă, inclusiv așternut, materiale pentru cuiburi, elemente de îmbunătățire	Prezența și consistența materiilor fecale
		Așternut umed, de exemplu, ca urmare a poliuriei
		Prezența vomei sau a sângelui
		Dacă animalul folosește elemente pentru îmbunătățire, de exemplu material

		pentru cuiburi, piese de ros
Comportamente	Interacțiune socială	Modificarea de la temperamentul normal – interacțiuni aprehensive/agresive cu alte animale; anxietate (de exemplu, reacții marcate de evadare, ascundere)
		Izolată sau retrasă de alte animale din grupul social
	Comportamente nedorite	Comportament repetitiv/ stereotipizat
		Smulgerea părului (rozătoare), tricotilomanie
		Agresivitate crescută în raport cu oamenii sau cu alte animale
	Postură și mobilitate	Postură anormală
		Mers anormal; șchiopătare; lipsa mișcării/letargie/reticența la mișcare în cazul în care este stimulat
		Mișcări necoordonate
		Abdomen aplecat; cap aplecat
	Altele	Tremur
Crize/convulsii/spasme		
Vocalizare; spontană sau invocată. <i>(Notă – Unele specii, de exemplu, rozătoarele, vocalizează de regulă în intervalul de sunete ultrasonice, prin urmare, vocalizările care pot fi auzite reprezintă o preocupare deosebită. De asemenea, vocalizările iepurilor sunt, în general, imperceptibile de către oameni, cu excepția cazului când animalul prezintă o suferință).</i>		
Indicatori specifici procedurii	Aceștia sunt identificați pe baza proiectului individual, a potențialului său de efecte adverse și a indicatorilor neașteptați ai acestora	De exemplu, într-un model EAE indicatorii pot include: pierderea tonusului cozii, slăbirea membrilor posterioare, slăbirea membrilor anterioare, paralizie, pierderea funcției vezicii urinare
Observații libere	O schemă a evaluării severității ar trebui să includă întotdeauna posibilitatea de a nota toate observațiile cu privire la impacturile negative neașteptate asupra bunăstării.	

Apendicele II

Bibliografie generală, orientări și resurse online privind evaluarea bunăstării animalelor supuse unor proceduri științifice

American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM) (2006) *Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits*, disponibil la adresa <http://www.tinyurl.com/65ez5vh>

Assessing the Health and Welfare of Laboratory Animals (AHWLA) resursă de formare. A se vedea <http://www.ahwla.org.uk/index.html>

Canadian Council on Animal Care (CCAC) *Welfare assessment*. A se vedea <http://www.ccac.ca/> click pe Three Rs microsite, apoi căutare după expresia „welfare assessment” (engleză sau franceză)

Categorising the severity of scientific procedures on animals - Summary and reports from three round-table discussions edited by Jane A. Smith and Maggy Jennings on behalf of the Boyd Group and the RSPCA, July 2004
Publicat de RSPCA Research Animals Department

FELASA Working Group on the Reporting of Clinical Signs in Laboratory Animals (2012) – (sub tipar)

Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (2008) *Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press
Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (2009) *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press. A se vedea http://dels.nas.edu/animal_pain/

Johansen R, Needham JR, Colquhoun DJ, et al. (2006) Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. *Laboratory Animals* **40**: 323–340

Joint Working Group on Refinement (2011) A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals. *Laboratory Animals* **45**: 1-13

Leach MC et al. (2008) Identification of appropriate measures for the assessment of laboratory mouse welfare. *Animal Welfare* **17**: 161-170

National Centre for the Three Rs (NC3Rs) *Welfare assessment*. A se vedea <http://www.nc3rs.org.uk/welfareassessment>

National Health and Medical Research Council (2008) *Guidelines to Promote the Wellbeing of Animals used in scientific purposes: The Assessment and Alleviation of Pain and Distress in Research Animals*. Canberra: Guvernul Australiei. A se vedea <http://www.nhmrc.gov.au> și căutare după “pain and distress”

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical signs as humane endpoints*

for experimental animals used in safety evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment nr. 19. Paris: OECD

Wells DJ, Playle LC, Enser WEJ, et al. Assessing the welfare of genetically altered mice. Versiunea integrală la <http://www.nc3rs.org.uk/gamice>. Rezumatul în *Laboratory Animals* **40**: 111–114

Workman P et al. (2010) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* **102**: 1555-1577, disponibil la adresa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883160/?tool=pubmed>

1.2 Sugestii de reviste utile pentru informații suplimentare

<i>Applied Animal Behaviour Science</i>	http://www.applied-ethology.org/applied_animal_behaviour_science.html
<i>Animal Technology and Welfare</i>	http://www.iat.org.uk/publications/atw.htm
<i>Animal Welfare</i>	http://www.ufaw.org.uk/animal.php
<i>Contemporary Topics in Laboratory Animal Science and Journal of the American Association for Laboratory Animal Science</i>	http://www.aalas.org/publications/index.aspx#ct
<i>Lab Animal and Lab Animal Europe</i>	http://www.labanimal.com/laban/index.html http://www.labanimaleurope.eu/
<i>Laboratory Animals</i>	http://la.rsmjournals.com/

1.3 Sugestii de cuvinte cheie pentru căutarea în literatura de specialitate

Următoarele cuvinte cheie sunt utile atunci când se caută informații privind evaluarea severității:

afecta	evaluare prejudiciu beneficiu	indicatori pozitivi	scară de severitate
bunăstarea animalelor	puncte finale umanizate	bunăstare pozitivă	comportament de boală
suferința animalelor	nevoi	evaluare calitativă a comportamentului	stres
evaluare	evaluare obiectivă	calitatea vieții	suferință
disconfort	durere	ameliorare	evaluarea bunăstării
suferință	evaluarea durerii	fișe de notare	indicator de bunăstare
evaluarea prejudiciilor	măsurarea durerii	sistem de notare	rezultate ale bunăstării

Referințe privind clasificarea gradului real de severitate

CCAC (1998) *Guidelines on: Choosing an Appropriate Endpoint in Experiments Using Animals for Research, Teaching and Testing*. Canadian Council on Animal Care, disponibil la adresa: http://www.ccac.ca/en/_standards/guidelines (engleză) și http://www.ccac.ca/fr/_normes/lignes_directrices (franceză)

FELASA Working Group on Pain and Distress (1994) Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. *Laboratory Animals* **28**: 97-112

Jones HRP, Oates J and Trussell BA (1999) An applied approach to the assessment of severity. In: Hendriksen CFM. & Morton DB (eds), *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research*. Proceedings of the International Conference, 22-25 November 1998, Zeist, The Netherlands. Royal Society for Medicine Press Ltd., London pp 40-47

LASA /APC (2008) *Final Report of a LASA/APC Working Group to Examine the Feasibility of Reporting Data on the Severity of Scientific Procedures on Animals*. Disponibil la adresa: <http://www.lasa.co.uk/publications.html>

Morton, DB and Hau J (2011) Chapter 18: Welfare assessment and humane endpoints. In *Handbook of Laboratory Animal Science, 3rd Edition, Volume 1 Essential Principles and Practices*. Hau J and Schapiro, SJ (eds), CRC Press LLC, USA, pp 535-572

Prescott MJ, Morton DB, Anderson D, Buckwell A, Heath S, Hubrecht R, Jennings M, Robb D, Ruane B, Swallow J and Thompson P (2004) Refining dog husbandry and care, Eighth report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals* **38 Suppl 1**: S1:1-S1:94

Wolfensohn S and Lloyd M (2003) *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, 3rd Edition*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford (a patra ediție în pregătire)

(Toate URL-urile au fost consultate ultima dată la 24 mai 2012.)

Exemple pentru ilustrarea procesului de clasificare a severității, de evaluare zilnică și de evaluare a gradului real de severitate

Bruxelles, 11 ianuarie 2013

Documentul de lucru privind un cadru de evaluare a severității elaborat de grupul de experți al Comisiei Europene și aprobat de autoritățile naționale competente pentru punerea în aplicare a Directivei 2010/63/UE privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice în cadrul reuniunii acestora din iulie 2012 a recomandat elaborarea unor exemple pentru a ilustra „procesul de evaluare a severității, de evaluare zilnică și de evaluare a gradului real de severitate” și punerea acestora la dispoziția comunității științifice.

În acest sens, grupul de experți a elaborat o serie de exemple pentru a ilustra modul în care procesul descris în *documentul de lucru* ar putea fi aplicat în cazul diferitelor proceduri. Exemplele sunt menite să sprijine autoritățile competente, utilizatorii, tehnicienii veterinari, medicii veterinari și toate celelalte categorii de personal relevante pentru a asigura faptul că durerea, suferința și stresul animalelor sunt în mod eficient prevăzute, recunoscute, ameliorate, dacă este posibil, și evaluate în mod coerent pe durata procedurilor. Prezentul document a fost aprobat de către autoritățile naționale competente pentru punerea în aplicare a Directivei 2010/63/UE în cadrul reuniunii acestora din 23-24 ianuarie 2013.

Este esențial ca, atunci când exemplele sunt utilizate, să fie luați în considerare o serie de factori importanți:

- Se presupune că, pe întreaga durată a procesului, **sunt puse în aplicare bune practici** privind adăpostirea, creșterea și îngrijirea; procedurile de îmbunătățire; educația și formarea; competența de evaluare; colectarea și aplicarea informațiilor actuale privind înlocuirea, reducerea și îmbunătățirea, precum și conceptul experimental.
- Fișele de notare din cadrul exemplelor sunt elaborate astfel încât **să completeze – și nu să substituie – decizia formulată de personalul instruit, competent și empatic**. Scopul este de a permite o observare, o evidență și o evaluare mai sistematice și mai obiective ale suferinței și nu de a trece peste raționamentul profesional.

- Fiecare exemplu se referă la **o situație ipotetică, dar realistă**. Nu ar fi adecvat să se includă toate detaliile care ar fi disponibile în practică, dar sunt incluse suficiente detalii **pentru a explica modul în care procesul a fost aplicat**.
- Astfel cum s-a precizat în *documentul de lucru*, este esențial **să se analizeze și să se adapteze evaluarea severității** în funcție de specie, sușă și procedură astfel cum este efectuată în unitatea individuală de utilizare. Pe această bază, grupul de experți **recomandă categoric evitarea utilizării** sistemelor de tabele și fișe de notare din exemple exact în forma în care sunt prezentate, **inclusiv pentru aceleași proceduri**. Toate protocoalele de evaluare a severității ar trebui reexamineate cu regularitate în vederea eficacității și revizuite ori de câte ori este necesar.
- **Exemplele fac, de asemenea, obiectul revizuirii**, pe măsură ce sporesc cunoștințele cu privire la indicatorii de durere, suferință și stres și pe măsură ce abordările cu privire la evaluare și la clasificarea severității se modifică. Fiecare exemplu este prevăzut cu o dată, a se verifica website-ul CE http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/interpretation_en.htm pentru actualizări.
- **Ar fi binevenit feedback-ul** cu privire la utilitatea exemplilor, precum și sugestii referitoare la alte proceduri care trebuie incluse; vă rugăm să trimiteți observațiile dumneavoastră la adresa env-laboratory-animals@ec.europa.eu

Cuprins

Modelul 1 – Studii oncologice	23
<i>Modelul 1(a) Menținerea liniilor celulare tumorale umane la șoarecii nuzi imunocompromiși</i>	<i>24</i>
<i>Modelul 1(b) Eficacitatea agenților farmaceutici noi asupra extinderii tumorale</i>	<i>29</i>
Modelul 2 – Encefalita autoimună experimentală (EAE) la șoareci	35
Modelul 3 – Artrită	43
Modelul 4 – Accident vascular cerebral	52
Modelul 5 – Producerea de anticorpi policlonali la iepure	63
Modelul 6 – Producerea și menținerea animalelor modificate genetic (MG).....	68
<i>Modelul - GeneA^{tm1a(Funding)Lab}</i>	<i>69</i>
<i>Modelul - Tg(GeneB)^{Labcode}.....</i>	<i>74</i>
<i>Modelul - GeneC^{tm1a(Funding)Lab}</i>	<i>77</i>

Exemple pentru ilustrarea procesului de evaluare a severității

Modelul 1 – Studii oncologice (1a și 1b)

Ultima actualizare:05/02/2013

1. Modelele animale în studiile oncologice (1a și 1b)

Context general: Evaluarea *in vivo* a noilor agenți anticancerigeni

Cancerul este o cauză majoră de deces în țările dezvoltate, iar îmbătrânirea populației umane va conduce în mod inevitabil la creșterea implicațiilor bolii. În 2010, probabilitatea de deces cauzat de cancer în UE înainte de vârsta de șaptezeci de ani a fost de aproximativ unul la șapte cazuri. Prin urmare, este necesară dezvoltarea de medicamente noi mai eficiente pentru tratarea cancerului. Printre beneficii se vor număra reducerea mortalității cauzate de cancer, precum și îmbunătățirea calității vieții pentru cei care se vor îmbolnăvi de cancer în viitor.

Modelele animale sunt utilizate în prezent pentru dezvoltarea de noi medicamente pentru tratamentul cancerului, în plus față de modelarea pe calculator și metodologiile *in vitro* cum ar fi testele de cultură celulară. Din momentul în care selectivitatea și activitatea compușilor au fost confirmate *in vitro*, numai compușii care prezintă caracteristici favorabile sunt testați pe animale. Studiile privind tolerabilitatea sunt efectuate pe grupuri mici de animale pentru a stabili doza maximă tolerată (DMT) și caracterul adecvat al regimului de dozare anterior derulării de studii mai ample privind eficacitatea.

Severitatea efectelor asupra animalelor va depinde de modelele și de scopul studiului. De exemplu, menținerea liniilor celulare tumorale nu ar trebui să aibă un impact semnificativ asupra bunăstării, cu condiția respectării bunelor practici pe durata studiului, inclusiv monitorizarea adecvată a animalului și sacrificarea timpurie prin metode umane. Cu toate acestea, este probabil ca studiile în vederea evaluării tratamentelor noi în modelele metastatice să prezinte o preocupare deosebită în ceea ce privește bunăstarea din cauza dezvoltării de tumori multiple și a posibilelor efecte adverse ale medicamentelor citotoxice.

Au fost publicate o serie de orientări privind bunăstarea și utilizarea animalelor în cercetările în domeniul cancerului, de exemplu, în *British Journal of Cancer* (Workman et al. 2010). Acestea oferă o prezentare detaliată cu privire la diferitele modele tumorale la animale care sunt disponibile, modul în care acestea au un impact asupra animalelor și metodele prin care suferința poate fi redusă la minimum.

Două exemple care ilustrează modele animale oncologice cu grade de severitate diferite sunt incluse aici.

Referință

Workman et al. (2010) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* (2010) 102(11), 1555 – 1577; descărcare gratuită de la adresa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883160/pdf/6605642a.pdf>

1 (a) – Menținerea liniilor celulare tumorale umane la șoarecii nuzi imunocompromiși

Unele linii celulare tumorale umane nu se reproduc în mod fiabil în culturi și ocazional este necesară caracterizarea și menținerea liniilor celulare umane în cadrul unui model xenogen *in vivo*.

Studiu

30 de șoareci nuzi masculi de tip BALB/C vor fi injectați subcutanat pe partea stângă cu 10^3 HCT 116 suspensie celulară în 0,1 ml soluție salină. Animalele vor fi adăpostite în grup în cuști ventilate individual (IVC) cu așternut și materiale pentru cuib. Bunăstarea animalelor va fi evaluată zilnic, iar animalele vor fi cântărite o dată la patru zile. Indivizii vor fi palpați pentru depistarea tumorilor la fiecare două zile și toate tumorile detectabile vor fi, de asemenea, măsurate cu ajutorul unui șubler o dată la două zile. Animalele vor fi sacrificate în ziua 15 pentru recoltarea tumorilor.

Evaluare prospectivă inițială și analiza unor îmbunătățiri specifice și a unor puncte finale de sacrificare prin metode umane

Ce acțiuni asupra animalelor presupune studiul?	Ce vor experimenta animalele? Câtă suferință ar putea fi cauzată? Ce ar putea să o înrăutățească?	În ce mod va fi redusă la minimum suferința?	
	Efecte adverse	Metodologie și intervenții	Puncte finale de sacrificare
Menținerea șoarecilor imunocompromiși	Animalele sunt sensibile la infecție	Adăpostire în sisteme IVC și practici de creștere adaptate pentru a reduce la minimum riscul de contaminare Animale adăpostite în grup și îmbunătățiri aduse mediului de viață pentru a reduce stresul	Orice animal care prezintă semne de îmbolnăvire va fi sacrificat

		Creșterea și îngrijirea vor fi revizuite în cazul în care se observă semne de suferință, agresiune sau comportamente anormale	
Injecție subcutanată de celule tumorale	Disconfort tranzitoriu în urma injectării	Injecție efectuată o singură dată Se va injecta un volum corespunzător (maximum 0,2ml) Animalele vor fi monitorizate îndeaproape în perioada imediat următoare injectării	Animalele vor fi sacrificate prin metode umane în cazul în care, în urma injectării, se observă mai mult decât o suferință sau un disconfort superficial, fără o recuperare rapidă (foarte rar)
Extinderea tumorii	Poate cauza disconfort sau poate afecta comportamentul sau locomoția normală Tumora se poate infecta sau poate ulceră (dar nu ar trebui să intre în metastază)	Extinderea tumorii va fi măsurată o dată la două zile Schema de monitorizare va include observarea atentă a posturii, a mersului precum și a dimensiunii și stării tumorii	Animalul va fi sacrificat dacă tumora ulcerează sau dacă afectează comportamentul, postura sau locomoția normală sau dacă depășește 1,2 cm în diametru (Workman et al. 2010)

Analiză

Se estimează că animalele vor suporta doar un disconfort **SUPERFICIAL** și vor fi sacrificate în cazul în care problemele de sănătate sau cele legate de bunăstare depășesc acest nivel.

Prin urmare, este adecvată o clasificare prospectivă a gradului de severitate de nivel SUPERFICIAL.

La sfârșitul modelului este inclus un model de fișă de observație completată.

Observații clinice

A fost elaborată o fișă de notare de bază axată pe dimensiunea tumorii, greutate corporală, postură și mers deoarece erau preconizate puține alte semne clinice. A fost inclus un spațiu pentru semnele clinice neașteptate, pentru ca acestea să fie înregistrate ca text liber. Inserarea notației NAD (nu sunt depistate anomalii) confirmă faptul că animalele au fost verificate și nu a au fost observate anomalii. Un exemplu este inclus în cele ce urmează.

Rezultate

- Nu a fost înregistrată o pierdere semnificativă în greutate la niciun animal.
- La 5 animale nu a fost observată o creștere a tumorii.
- La 25 de animale tumorile s-au dezvoltat pe partea injectată. Tumorile nu au afectat comportamentul normal și au avut un diametru de maximum 1 cm în ziua 14 atunci când animalele au fost sacrificate în conformitate cu protocolul de studiu în vederea recoltării tumorilor.
- Într-o singură cușcă s-a înregistrat un comportament agresiv și au avut loc câteva încăierări; un animal prezenta răni în urma mușcăturilor la nivelul cozii și pe spate și a fost separat într-o cușcă individuală, rănilor au fost dezinfectate local până la vindecarea acestora, iar animalul a fost păstrat până la încheierea procedurii.

Evaluarea gradului real de severitate

- 29 de animale au încheiat studiul fără a suporta mai mult de o suferință superficială legată de injectare și creșterea tumorilor. Gradul real de severitate pentru acestea a fost considerat **SUPERFICIAL**. 1 animal a prezentat răni prin mușcare care au fost tratate în mod eficient. La animalul respectiv, a existat o suferință adițională ca rezultat al agresiunii, dar aceasta a fost independentă de procedură. Incidentele au fost gestionate în mod eficient, iar suferința a fost redusă la minimum. Deși nivelul de suferință suportat de animalul respectiv a fost unul moderat, întrucât incidentul a fost independent de procedură, gradul real de severitate al procedurii care trebuie raportat a fost considerat cel **SUPERFICIAL**.

Exemplu de fișă de observație (completată pentru cazul ipotetic)

Extinderea tumorii la șoarecii nuzi – Procedură și fișă de observație				
Cușca 1 – Șoareci nr. 1-5				
Data	Procedura	Dimensiunea tumorii (cm)	Greutate (g)	Observații clinice – a se verifica cu atenție postura și mersul
28.02	Injectie s.c.		1- 21 2- 22 3- 21 4 -22 5- 22	Nu sunt semne de probleme privind bunăstarea în urma injecțiilor

01.03				Nu sunt depistate anomalii (NAD)
02.03	Palpare			NAD
03.03				NAD
04.03	Palpare		1- 21 2- 22 3- 21 4 -22 5- 22	NAD
05.03				NAD
06.03	Palpare			NAD
07.03				Unele comportamente agresive; fără răni evidente
08.03	Măsurarea tumorii	1 – 0,1 2 – 0,1 3 – 0,1 4 – nu există tumoră 5 – 0,2	1- 21 2- 22 3- 21 4 -22 5- 22	Șoarecele 1 prezenta răni prin mușcare la nivelul cozii și pe spate – tratament local; transferat în cușcă individuală. O cutie-cuib a fost furnizată pentru animalul adăpostit individual, dar fost scoasă din cușca în care un rămas restul de patru șoareci pentru eventualitatea în care aceasta a determinat agresiunea
09.03				Răni dezinfectate pentru șoarecele nr. 1, cu evoluție bună; niciun semn de agresiune între celelalte animale rămase
10.03	Măsurarea tumorii	1 – 0,2 2 – 0,1 3 – 0,1 4 – nu există tumoră 5 – 0,2		Răni dezinfectate pentru șoarecele nr. 1
11.03				Răni dezinfectate pentru șoarecele nr. 1
12.03	Măsurarea tumorii	1- 0,4 2 – 0,3 3 – 0,3	1- 22 2- 22 3 - 21	Răni vindecate în cazul șoarecelui nr. 1, întreruperea dezinfectării.

		4 – nu există tumoră 5 – 0,5	4 -21 5- 23	
13.03				NAD
14.03	Sacrificarea și recoltarea tumorilor.			

1 (b) Eficacitatea noilor agenți farmaceutici asupra extinderii tumorii – Procedura în mai multe etape

Studiul vizează evaluarea eficacității noilor agenți în termeni de reducere sau de stopare a creșterii celulelor tumorale. Tumora trebuie să fie bine stabilită înainte ca tratamentul să poată începe (de regulă, un diametru de 0,5 cm este suficient) – din cauza duratei studiului, unele tumori se pot dezvolta până la un diametru de maximum 1,2 cm, de regulă în grupul martor tratat cu vehicul. Medicamentele citotoxice pot provoca unele efecte adverse asupra bunăstării.

30 de șoareci masculi nuzi de tip BALB/C vor fi injectați cu celule tumorale cu un ritm scăzut de creștere (0,1 ml). Bunăstarea animalelor va fi evaluată zilnic, iar animalele vor fi cântărite o dată pe săptămână timp de 3 săptămâni consecutive. Extinderea tumorii va fi măsurată cu ajutorul unui șubler în ziua 7 și în ziua 14; în ziua 20, tumorile vor fi măsurate din nou, animalele vor fi distribuite aleatoriu și se va începe tratamentul sub forma unor injecții intra-peritoneale de două ori pe zi timp de 7 zile.

Evaluare prospectivă inițială și analiza unor îmbunătățiri specifice și a unor puncte finale de sacrificare prin metode umane

Ce acțiuni asupra animalelor presupune studiul?	Ce vor experimenta animalele? Câtă suferință ar putea fi cauzată? Ce ar putea să o înrăutățească?	În ce mod va fi redusă la minimum suferința?	
	Efecte adverse	Metodologie și intervenții	Puncte finale de sacrificare
Menținerea șoarecilor imunocompromiși	Animalele sunt sensibile la infecție	Adăpostire în IVC și practici de creștere adaptate pentru a reduce la minimum riscul de contaminare Animale adăpostite în grup și îmbunătățiri aduse mediului de viață pentru a reduce stresul Creșterea și îngrijirea vor fi revizuite în cazul în care se observă semne de suferință, agresiune sau comportamente anormale	Orice animal care prezintă semne de boli intercurrente va fi sacrificat
Injecție subcutanată de celule tumorale	Disconfort tranzitoriu în urma injectării	Injecție efectuată o singură dată Se va injecta un volum corespunzător (maximum 0,2ml)	Animalele vor fi sacrificate prin metode umane în cazul în care, în urma injectării, se observă mai mult

		Animalele vor fi monitorizate îndeaproape în perioada imediat următoare injectării	decât o suferință sau un disconfort superficial, fără o recuperare rapidă (foarte rar)
Extinderea tumorii	Poate cauza disconfort sau poate afecta comportamentul sau locomoția normală Tumora folosită se poate infecta sau poate ulceră (dar nu ar trebui să intre în metastază)	Observarea zilnică a animalelor, monitorizarea regulată a stării generale de sănătate și a extinderii tumorii Schema de monitorizare va include observarea atentă a posturii, a mersului și a dimensiunii și stării tumorii Intervențiile farmaceutice vor începe atunci când tumora ajunge la un diametru de 0,5 cm (măsurată cu ajutorul unui șubler)	Animalul va fi sacrificat dacă tumora ulcerează sau dacă afectează comportamentul, postura sau locomoția normală sau dacă depășește 1,2 cm în diametru (Workman et al. 2010)
Injectarea intra-peritoneală a noului agent farmaceutic	Disconfort tranzitoriu în urma injectării Medicamentele citotoxice pot cauza diaree, pierdere în greutate, anorexie sau letargie	Animalele vor fi monitorizate îndeaproape în perioada imediat următoare injectării Volum maxim de 10ml/kg zilnic timp de 7 zile Vor fi utilizate dozele minime (determinate în urma studiilor privind dozarea) Se va utiliza un sistem de notare clinică pentru evaluarea bunăstării	Animalele vor fi sacrificate dacă pierderea în greutate depășește 20 % din greutatea corporală inițială. Animalele care nu se hrănesc sau care prezintă diaree mai mult de 48 de ore vor fi sacrificate. O limită superioară a notării clinice va fi stabilită ca punct final de sacrificare printr-o metodă umană.

Analiză

Ca urmare a dimensiunii tumorii, a potențialului crescut de ulcerare, a frecvenței injecțiilor și a efectelor adverse ale medicamentelor administrate, o **clasificare prospectivă a severității de nivel MODERAT** este adecvată în acest caz.

Este posibil ca limita de severitate să fie SUPERFICIALĂ?

Foarte puțin probabil, cu excepția cazului în care obiectivele științifice ar putea fi atinse cu puncte finale stabilite mai devreme, de exemplu prin reducerea dimensiunii maxime a tumorii. Acest lucru ar implica, de asemenea, injectarea de medicamente într-o doză cunoscută ca nefiind susceptibilă să cauzeze efecte clinice adverse semnificative. În aceste circumstanțe, ar putea fi considerată adecvat un grad de severitate de nivel **SUPERFICIAL**.

Observații clinice

La sfârșitul modelului sunt incluse o fișă de observație și un model de fișă de notare.

Rezultate

Dintre cei 30 de șoareci masculi de tip BALB/C, 25 au fost folosiți pentru evaluarea eficacității; 10 animale au primit medicamentul B în doza H, 10 medicamentul B în doza X și 5 medicamentul C în doza Y.

Evaluarea gradului real de severitate

- 3 animale nu au dezvoltat tumori și au fost sacrificate ca fiind inutilizabile în cadrul experimentului – **SUPERFICIAL**
- 2 animale au dezvoltat ulcerații la locul injectării tumorii înainte de începerea tratamentului și au fost sacrificate – **MODERAT**
- 10 animale cărora li s-a administrat medicamentul B în doza H au prezentat tumori care au rămas relativ mici, fără o pierdere în greutate semnificativă și fără semne clinice – **SUPERFICIAL**
- 7 animale cărora li s-a administrat medicamentul B în doza X au prezentat o scădere a dimensiunii tumorii, o pierdere în greutate de 15 %, materii fecale moi, dar au fost păstrate până la sfârșitul experimentului – **MODERAT**
- 3 animale cărora li s-a administrat medicamentul B în doza X au prezentat o scădere a dimensiunii tumorii, o pierdere în greutate de 15 %, materii fecale moi, anorexie și erau foarte letargice; acestea au fost sacrificate printr-o metodă umană în ziua 25 – **SEVER**
- 5 animale cărora li s-a administrat medicamentul C în doza Y au prezentat o creștere constată a dimensiunii tumorii, greutatea corporală a crescut, niciun semn clinic în afară de extinderea tumorii. Animalele au fost sacrificate atunci când dimensiunea tumorii a depășit 1,2 cm – **MODERAT**

Exemplu de fișă de notare

Animal nr.				
Data	01.06	02.06	03.06	04.06
Aspect				
Greutate corporală				
Starea blănii				
Funcții fiziologice				
Dispnee și/sau tahipnee				
Aportul de hrană				
Mediu				
Materii fecale moi sau diaree				
Sânge în diaree				
Comportamente				
Manipulare				
Agresiune				
Mers anormal				
Postură anormală				
Reticență la mișcare				
Indicatori specifici procedurii				
Dimensiunea tumorii				
Ulcerarea tumorii				
Tumora împiedică mișcarea				
Punctaj total				
Alte observații				

Exemple de punctaje clinice

Aspect	Punctaj
Greutate corporală	
Pierdere în greutate de 5-10 %	1
Pierdere în greutate de 11-15 %	2
Pierdere în greutate de 16-20 %	3
Pierdere în greutate de 20 % +	HEP
Starea blănii	
Blană ușor neîngrijită	1
Pilozitate ușoară	2
Pilozitate accentuată	3
Funcții fiziologice	
Tahipnee (respirație rapidă)	1
Dispnee (respirație greoaie)	3
Mediu	
Materii fecale moi sau diaree	1
Sânge în diaree	HEP
Comportament	
Tensionat și nervos la manipulare	1
În suferință accentuată în momentul manipulării, de exemplu tremur, vocalizare, agresiv	3
Locomoție	
Mers/postură ușor anormală	1
Mers/postură în mod semnificativ anormală	2
Probleme de mobilitate semnificative/reticență la mișcare	3

Acțiuni	
Punctaj 1	Revizuirea frecvenței monitorizării
2	Luarea în considerare a unei îngrijiri suplimentare, de exemplu, aport de fluide
4	Consultarea unui medic veterinar
6	Aplicarea punctului final de sacrificare prin metode umane

Imobilitate >24h	HEP
Indicatori specifici procedurii	
Dimensiunea tumorii >1,2cm	HEP
Ulcerarea tumorii	HEP
Tumora împiedică mișcarea	HEP

Exemple pentru ilustrarea procesului de evaluare a severității Modelul 2 – Encefalita autoimună experimentală (EAE) la șoareci

Ultima actualizare: 05/02/2013

Context general

Encefalomielita autoimună experimentală (EAE) este folosită pentru a prezenta modele ale diferitelor aspecte ale sclerozei multiple (SM) la rozătoare și primat. SM este o tulburare neurologică multiformă, complexă care se manifestă la adulții tineri. Printre simptome se numără inflamarea, demielinizarea și pierderea axonală. Modelele animale sunt utilizate pentru a efectua cercetări cu privire la fiziopatologia bolii și pentru a evalua potențialele strategii protective sau curative, inclusiv imunomodularea, imuno-protecția, regenerarea axonală și repararea mielinei. Caracteristicile multiforme-multifazice ale SM necesită utilizarea unor modele adecvate pentru abordarea aspectelor specifice referitoare la diferitele stadii ale bolii.

EAE implică generarea de activitate la nivelul sistemului imunitar care vizează mielina, fapt care provoacă o reacție inflamatorie la nivelul sistemului nervos central și deschiderea barierei de trecere a sângelui în creier. Aceasta poate cauza un sindrom neurologic sever la modelul animal, care ar trebui urmat de o recuperare parțială în timpul primei etape recurent remisive cronice. Această etapă este asociată cu inflamația și demielinizarea reversibilă. După 9-10 săptămâni, animalul va intra în forma progresivă care este asociată cu demielinizarea cronică și pierderea axonală. În această etapă este posibilă evaluarea diferitelor strategii terapeutice. Punctele finale de sacrificare prin metode umane și științifice trebuie alese cu atenție, ținând seama de obiectivele studiului.

Referințe

- Emerson MR *et al.* (2009) Enhancing the ability of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis to serve as a more rigorous model of Multiple Sclerosis through refinement of the experimental design. *Comparative Medicine*. **59**: 112-128
- Miller SD *et al.* (2010) Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the mouse. *Current Protocols in Immunology*. **88**: 15.1.1 – 15.1.20
- Weissert R (ed) (2012) *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis - Models, Disease Biology and Experimental Therapy*, In Tech, DOI: 10.5772/1190, <http://www.intechopen.com>
- Wolfensohn S *et al.* (in prep) Reducing suffering in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.

Studiu

În acest exemplu, EAE va fi indusă la un număr de patru șoareci masculi și patru șoareci femele de tip Biozzi ABH (o sușă folosită pe scară largă considerată cu valoare translațională ridicată), pentru a evalua o posibilă terapie pentru SM. În etapa inițială de planificare a proiectului, utilizatorul are în vedere fiecare efect advers asupra animalelor și identifică cauzele potențiale de suferință, în urma discuțiilor cu tehnicianul veterinar și personalul de îngrijire, precum și cu medicul veterinar. Aceștia au cercetat modalități de îmbunătățire, care sunt puse în aplicare în cadrul proiectului. Șoarecii vor fi adăpostiți în grupuri de 4 de același sex. O atenție deosebită va fi acordată mediului local, întrucât animalele cu EAE vor avea deficiențe motorii semnificative. Cuștile vor fi prevăzute cu pardoseală solidă, așternut din rumeguș, refugii adecvate și materiale pentru așternut și piese de ros. Animalele vor fi tratate cu un adjuvant antiinflamator pentru a induce EAE și vor fi monitorizate pe perioada recuperării și a etapei recurent remisive (9-10 săptămâni). După dezvoltarea formei progresive, compușii terapeutici candidați vor fi evaluați pe șoareci în cadrul unui studiu de trei săptămâni.

Evaluarea prospectivă inițială și analiza unor ameliorări specifice și a unor puncte finale de sacrificare prin metode umane

Ce acțiuni asupra animalelor presupune acest studiu?	Ce vor experimenta animalele? Câtă suferință ar putea fi cauzată? Ce ar putea să o înrăutățească?	În ce mod va fi redusă la minimum suferința?	
	Efecte adverse	Metodologie și intervenții	Puncte finale de sacrificare
Injecții multiple cu adjuvantul inflamator	Disconfort sau durere ca urmare a pregătirii injecției Posibilă reacție la locul injecției, cauzând iritație sau disconfort	Doze mici vor fi injectate în mai multe locuri subcutanate (nu în pernița labei sau la baza cozii) Adjuvantul și vehiculul sunt create astfel încât să fie cât mai puțin posibil iritante Animalele vor fi monitorizate după injecție	Animalele vor fi sacrificate printr-o metodă umană în cazul în care, în urma injectării, se observă mai mult decât o durere sau o suferință moderată tranzitorie
Inducerea EAE – sindrom neurologic inițial sever urmat de o etapă de recuperare	Paralizie care poate cauza suferință sau anxietate: pierderea tonusului cozii, slăbirea membrelor posterioare, hipomotilitate, paralizia membrelor, disfuncție urinară (incontinență sau retenție)	Funcția urinară va fi monitorizată prin controlul zilnic al vezicii urinare. Vezica urinară va fi evacuată manual dacă este necesar în cazurile de retenție (monitorizarea atentă a semnelor de	HEP pentru oricare dintre următoarele criterii: <ul style="list-style-type: none"> • paralizie bilaterală a membrelor anterioare timp de >24h • paralizie bilaterală a membrelor

		<p>durere sau suferință cauzate de golirea vezicii urinare)</p> <p>Dacă animalele prezintă incontinență, cușca va fi verificată în mod frecvent pentru așternutul și materialul de așternut umed; înlocuirea acestuia cu materiale noi dacă este necesar</p> <p>Vor fi furnizate refugii și materiale de așternut adecvate</p>	<p>posterioare de până la 5 zile</p> <ul style="list-style-type: none"> • orice semn de auto-mutilare • retenție urinară persistentă/Incapacitatea de urinare • pareză (pierderea capacității de mișcare; paralizie ușoară) • pierdere în greutate de 35 %* • încetarea alimentării cu hrană sau apă timp de >24h după declanșarea bolii • nerecuperarea în urma EAE la 3 săptămâni de la declanșarea bolii clinice • semne clinice de boală intercurentă, de exemplu curbarea spatelui
	Pierdere semnificativă în greutate (de exemplu, de până la 35 %)	<p>Se va asigura accesul constant la apă și hrană, plasate în recipiente pe podeaua cuștii</p> <p>Greutatea corporală și starea generală vor fi monitorizate zilnic și notate cu o frecvență crescută (dacă este necesar) din momentul începerii pierderii în greutate</p> <p>Se va furniza hrană înmuiată și complexe de lichide cu suplimentare subcutanată dacă este necesar</p>	
Evoluția clinică recurent-remisivă	Deficiențe neurologice cronice	<p>Toți factorii de stres vor fi reduși, inclusiv nivelurile de zgomot</p> <p>Temperatura ambiantă va fi ridicată după caz, cu ajutorul pernelor de încălzire, a așternuturilor și a materialelor de așternut suplimentare</p>	

Administrarea noului agent terapeutic (în timpul formei progresive)	Disconfort cauzat de injectare Efecte secundare sau lipsa eficacității agentului	Animalele vor fi monitorizate îndeaproape în urma injectării agentului candidat	Animalele vor fi sacrificate printr-o metodă umană dacă se observă oricare dintre indicatorii de mai sus sau dacă apar efecte secundare severe ca urmare a administrării noului agent terapeutic
---	---	---	--

* O pierdere în greutate de 35 % reprezintă un punct final extrem care necesită o justificare științifică solidă. În acest caz, pierderea semnificativă în greutate este inevitabilă, iar animalele se pot reface prin acordarea unui sprijin adecvat, de exemplu căldură suplimentară și hrănire adițională, inclusiv hrănire manuală dacă este necesar. Punctul final de 35 % este stabilit pentru acest studiu special ca modalitate de a reduce obligația de a induce EAE la alte animale naive, care ar fi semnificativ mai mare în cazul unui punct final mai „convențional” (de exemplu, 20 %).

Analiză

O clasificare **prospectivă a severității de nivel SEVER este considerată adecvată**, întrucât se așteaptă ca procedura să cauzeze o prejudiciere severă a bunăstării și condiției generale a animalelor.

Este posibil ca severitatea să fie MODERATĂ?

Deși severitatea prospectivă a acestui model ar trebui să fie întotdeauna SEVERĂ din motivele subliniate mai sus, clasificarea retrospectivă a severității poate fi MODERATĂ în funcție de durata studiului și de punerea în aplicare de HEP timpurii, astfel cum se indică în exemplu.

Observații clinice

Pe durata studiului, șoarecii au fost monitorizați de către tehnicienii veterinari și personalul de îngrijire folosindu-se un sistem de fișe de notare care în prealabil a fost adaptat la protocol în urma discuțiilor cu utilizatorii, tehnicienii veterinari, personalul de îngrijire și medicul veterinar. Acesta a inclus parametri legați de greutate, starea blănii, tonusul cozii, controlul vezicii urinare, redresare, mers, pareză și semne avansate (poziție de odihnă pe o parte; paralizie aproape completă; respirație rapidă, înceată sau profundă). Deoarece proiectul a implicat proceduri severe, animalele au fost monitorizate îndeaproape și au fost efectuate revizuirii permanente ale gradului de severitate de către utilizator, în colaborare cu organismul pentru bunăstarea animalelor, tehnicianul veterinar și medicul veterinar desemnat. În continuare este prezentat un exemplu ilustrativ de fișă de notare.

Exemplu de fișă de notare adecvată

Tabel. Fișă de notare clinică pentru șoareci cu EAE

Data:					
Aspectul					
Greutatea corporală					
Starea blăni					
Funcții fiziologice					
Controlul vezicii urinare					
Tonusul cozii					
Respirație					
Mediu					
Starea cuibului					
Comportament					
Comportament social					
Mers					
Indicatori specifici procedurii					
Poziția de odihnă pe o parte					
Momentul redresării					
Pareză					
Paralizie					
Alte observații					
(text liber)					

Note: Fiecare indicator a fost evaluat în conformitate cu sistemul din tabelul de mai jos, unde (de exemplu) „1” ar trebui introdus în tabel în dreptul criteriului „Tonusul cozii” dacă se observă un nivel scăzut de ridicare, iar „2” pentru „Starea cuibului” în cazul în care cuibul este dezorganizat.

Tabel. Sistem de evaluare pentru indicatorii din fișa de notare clinică pentru EAE

Punctaj:	1 = Superficial	2 = Moderat	3 = Sever
Pierdere în greutate	Până la 10 %	Între 10 % și 20 %	Între 20 % și 35 %
Starea blăni	Ușor neîngrijită	Lipsa aranjării	Pilozitate accentuată /prelungită
Controlul vezicii urinare – incontinență	Dovezi referitoare la un oarecare grad de pierdere a controlului, de exemplu, o cantitate mică de urină în cuib	O „scăpare” mai pronunțată a urinei	Incontinență
Controlul vezicii urinare – retenție	Vezica urinară poate fi palpată, dar se va goli în momentul manipulării	Un efort ușor mai mare pentru golirea vezicii urinare	Incapabil de urinare fără asistență; semne de disconfort/suferință în timpul sau după golirea manuală
Tonusul cozii	Ridicare scăzută sau ondularea cozii	Pierderea tonusului în jumătatea distală a cozii	Pierdere integrală a tonusului cozii
Respirație: rapidă, înceată sau profundă	Ușor	Moderat	Accentuat
Starea cuibului	Ușor dezorganizat	Câteva încercări de formare a cuibului, dar dezorganizat	Fără cuib
Comportament social	Nu se așteaptă nicio modificare în cazul suferinței superficiale; notarea începe de la 2	Interacțiune redusă cu alte animale	Interacțiune redusă considerabil; pasiv
Mers	Stângaci	Târâind un membru posterior	Își târâie ambele membre posterioare
Poziția de odihnă pe o parte	Nu se așteaptă nicio modificare în cazul suferinței superficiale sau moderate; notarea începe de la 3	Nu se așteaptă nicio modificare în cazul suferinței superficiale sau moderate; notarea începe de la 3	Prezentă
Timpul de redresare	Redresare înceată atunci când este	Dificultate accentuată în	Incapacitatea de a se redresa în

	așezat pe spate	momentul redresării	timp de 5 secunde de la așezarea pe spate
Pareză	Abducție înceată a membrilor anterioare atunci când este așezat pe spate	Întindere redusă a membrilor anterioare atunci când este așezat pe spate	Fără abducția membrilor anterioare
Paralizie completă sau aproape completă	Nu se așteaptă nicio modificare în cazul suferinței superficiale sau moderate; notarea începe de la 3	Nu se așteaptă nicio modificare în cazul suferinței superficiale sau moderate; notarea începe de la 3	Prezentă

Evaluarea gradului real de severitate

La sfârșitul procedurii, fișa de notare a fost revizuită pentru fiecare animal în parte pentru a se analiza punctajul fiecărui indicator și modul în care acesta a evoluat în timp.

- Doi șoareci au pierdut 8 % din greutatea corporală în urma inducerii EAE, prezentau o blană ușor neîngrijită și abducție înceată a membrilor anterioare, dar toți ceilalți indicatori au fost notați cu 2 în primele 5 zile din proiect. Ulterior, notarea acestora a scăzut la 1 sau 0 pentru fiecare indicator în timpul etapei recurente/remisive și pe durata experimentării medicamentului. Grad de severitate = **MODERAT**
- Trei șoareci au pierdut între 22 % și 32 % din greutatea corporală și au avut un punctaj format dintr-o combinație de 3, 2 și 1 în timpul etapei recurente/remisive și pe durata experimentării medicamentului. Grad de severitate = **SEVER**
- Un șoarece a pierdut 37 % din greutatea corporală în timpul etapei de post-inducere și a fost sacrificat printr-o metodă umană. Grad de severitate = **SEVER**
- Doi șoareci au pierdut 15 % și, respectiv, 18 % din greutatea corporală și au avut un punctaj format dintr-o combinație de 2 și 3 pentru toți ceilalți indicatori în primele 4 zile ale studiului. Ulterior, aceștia au fost notați cu o combinație de 1 și 2 în timpul etapei recurente/remisive și pe durata experimentării medicamentului. Grad de severitate = **SEVER**

Nu a fost observată paralizie și s-a dovedit prea dificilă evaluarea respirației în mediul din cușcă, astfel încât acestea au fost eliminate din fișele de înregistrare. Perioada crescută petrecută în refugii a fost frecvent notată în rubricile pentru text liber ca un indicator timpuriu al suferinței astfel încât aceasta a fost adăugată în fișe pentru proiecte viitoare.

6 animale considerate cu un nivel de suferință **SEVER**, 2 animale considerate cu un nivel de suferință **MODERAT**.

Oportunități pentru o aplicare sporită a celor trei R

Ulterior evaluării gradului real de severitate, utilizatorii s-au consultat cu colegii și au căutat în literatura de specialitate modalități suplimentare de îmbunătățire. Următoarele îmbunătățiri suplimentare au fost identificate:

- hrănirea anterioară a animalelor cu suplimente alimentare cu valoare energetică ridicată, cum ar fi jeleuri sau lapte condensat, înainte de administrarea adjuvantului
- utilizarea unei doze mai mici de adjuvant
- utilizarea unui protocol de studiu alternativ astfel încât durata proiectului să poată fi redusă

Acestea au fost adăugate la protocol pentru studiile viitoare cu intenția de a compara nivelurile reale de severitate în vederea stabilirii eficacității îmbunătățirilor.

Exemple pentru ilustrarea procesului de evaluare a severității

Modelul 3 – Artrită

Ultima actualizare:05/02/2013

Context general

Modelele animale de artrită sunt folosite pentru a studia patogeneza bolii și pentru evaluarea potențialelor medicamente antiartritice pentru uz clinic. Prin urmare, printre criteriile importante pentru selectarea modelului se numără similaritățile morfologice cu boala umană și capacitatea modelului de a prezice eficacitatea compușilor terapeutici candidați la oameni.

Modelele animale folosite cel mai frecvent pentru artrita reumatoidă includ: artrita indusă cu adjuvant la șobolan, artrita indusă cu colagen tip II la șobolan, artrita indusă cu colagen tip II la șoarece și artrita indusă cu antigen la mai multe specii (Bendele, 2001). Injectarea la baza cozii este folosită în mod curent deoarece oferă un răspuns imunogenic bun, deși în literatura de specialitate sunt raportate și alte locuri de injectare. De asemenea, se înregistrează variații considerabile ale sușelor în ceea ce privește susceptibilitatea, severitatea și latența la declanșarea artritei. De exemplu, susceptibilitatea liniilor modificate genetic (MG) de a dezvolta artrită poate fi modificată (consolidată sau eliminată) în funcție de efectele modificărilor genetice. La modelele animale de artrită care au fost folosite în mod frecvent și sunt astfel validate, declanșarea bolii va putea fi prezisă, iar tehnicile de evaluare vor putea fi bine definite și caracterizate. În astfel de modele, evaluările multiple, inclusiv analiza mersului și utilizarea filamentelor Von Frey, pot fi folosite comparativ cu măsurile observaționale individuale.

Trebuie notat faptul că este necesară efectuarea de revizuri regulate ale sușelor disponibile, ale protocoalelor și ale modalităților de îmbunătățire astfel încât să fie selectată (selectate) cea mai adecvată (cele mai adecvate) pentru aspectul științific supus cercetării pentru fiecare caz în parte (Joe et al, 1999).

Modelul prezentat în acest exemplu este o artrită indusă cu colagen tip II la șobolani care poate cauza o suferință severă. Prin urmare, furnizarea unei justificări științifice pentru utilizarea acesteia constituie o obligație absolută. Șobolani sunt imunizați împotriva colagenului heterolog tip II, care produce leziuni similare celor observate în cazul artritei reumatoide umane (Bendele, 2001). Poliartrita rezultată este caracterizată de o distrugere accentuată a cartilagiilor asociată cu o depunere complexă imună pe suprafețele articulare, resorbție osoasă și proliferare periosteală, sinovită moderată spre accentuată și inflamare periarticulară.

Referințe

Bendele, A.M. Animal models of rheumatoid arthritis, *J Musculoskel Neuron Interact* 2001; 1(4):377-385

Jasemian Y et al. (2011) Refinement of the collagen induced arthritis model in rats by infrared thermography. *Br. J. Med. & Med. Res.* **1(4)**: 469-477

Joe, B., Griffiths, M.M., Remmers, E.F., Wilder, R.L. Animal models of rheumatoid arthritis, *Current Rheumatology Reports* 1999 ; 1 139-149

Studiu

În acest exemplu, artrita va fi indusă la un număr de 18 masculi și 18 femele șobolani de tip Lewis prin injectare repetată de FIA (adjuvant Freund incomplet) și colagen. Locul injectării va fi la baza cozii. Tratamentul zilnic va începe după 10 zile (Z10), după instalarea artritei și se va continua timp de alte 14 zile (până în Z24). Scopul studiului va fi de a testa agenți terapeutici putativi. Datele publicate anterior cu privire la compuşii asociați au fost revizuite pentru a se analiza dacă administrarea de analgezice ar interfera cu obiectivele științifice și s-a stabilit că aceasta ar genera date experimentale confuze. Prin urmare, nu se vor administra analgezice pe durata instalării artritei sau în cazul martorilor și se va acorda o atenție deosebită metodelor nefarmaceutice de atenuare a durerii (de exemplu, îmbunătățirea creșterii) pentru a ameliora suferința.

Toate animalele vor fi observate și cântărite zilnic și notate pe o fișă de notare clinică generală și vor fi testate în Z0 (înainte de prima injectare) și în Z10 (înainte de începerea tratamentului), în Z13, Z16, Z20 și Z24. Testarea va include măsurări indirecte ale alterării funcției fizice precum diametrul articulațiilor (măsurat cu ajutorul șublerului) și notarea clinică conform sistemului de notare pentru artrită. Se vor aplica puncte finale de sacrificare prin metode umane pe baza punctajelor clinice (a se vedea mai jos).

**Evaluarea noilor agenți terapeutici farmaceutici într-un model de artrită la șobolan (colagen tip II)
Grad de severitate SEVER**

Ce acțiuni asupra animalelor presupune studiul?	Ce vor experimenta animalele? Câtă suferință ar putea fi cauzată? Ce ar putea să o înrăutățească?	În ce mod va fi redusă la minimum suferința?	
	Efecte adverse	Metodologie și intervenții	Puncte finale de sacrificare
Maximum trei injecții subcutanate de colagen bovin tip II în adjuvant Freund incomplet (FIA)	Stres reținut Durere tranzitorie, inflamare moderată la locul injectării și disconfort timp de 1-2 zile Posibilă ulcerare a pielii, dar puțin probabilă în cazul FIA	Atitudini empatice și manipulare competentă pe durata procedurilor Doză și compoziție standardizate alese astfel încât să se reducă la minimum inflamarea și durerea	În cazul în care ulcerarea pielii persistă sau se infectează, animalele vor fi sacrificate printr-o metodă umană
Instalarea artritei (Z0-Z10)	Disconfort, durere, incapacitate și suferință; animalul poate prezenta semne de boală inclusiv aspect apatic, inapetență, reticență la mișcare, pierdere în greutate, inflamarea articulațiilor, sunete ce poate fi auzite în momentul manipulării	Monitorizare clinică atentă utilizând o fișă de notare clinică generală, cu o creștere a frecvenței monitorizării în momentul declanșării semnelor clinice (de regulă, începând cu Z8-Z10) Furnizare de așternut moale și de materiale pentru cuib suplimentare pe durata studiului Acces ușor la apă și hrană (de exemplu, pe podeaua cuștii) pe durata studiului Se va folosi un sistem de notare clinică pentru artrită care evaluează gradul de inflamare și numărul de articulații afectate	Animalele vor fi sacrificate printr-o metodă umană atunci când ating punctajele clinice prestabilite pentru sacrificare printr-o metodă umană (a se vedea tabelul de mai jos)
Administrarea de agenți farmaceutici	Disconfort tranzitoriu în urma injectării	Monitorizare clinică atentă zilnică folosind o fișă de notare clinică	Se vor aplica metode umane de sacrificare dacă se înregistrează

(test și martor, de două ori pe zi) pe cale subcutanată sau intraperitoneală (din D10 până în Z24)	Pe baza datelor anterioare obținute pe animale, nu se așteaptă ca agenții farmaceutici să cauzeze efecte adverse	generală	efecte adverse semnificative
Evaluarea efectelor agenților farmaceutici asupra severității artritei (Z0, Z10, Z13, Z16, Z20 și Z24)	În funcție de metodele utilizate, poate apărea o durere sau un disconfort trecător adițional, de exemplu, utilizarea filamentelor Von Frey, utilizarea șublerului, obligația de manipulare	Monitorizare clinică atentă Reducerea frecvenței monitorizării (la frecvența minimă conformă obiectivelor științifice) până la recuperarea animalului	A se vedea tabelul de mai jos

Notă

Un sistem de notare clinică pentru artrită ar trebui discutat și aprobat de către cercetător, chirurgul veterinar și tehnicienii veterinari și personalul de îngrijire anterior începerii studiului.

Analiză

Ca o consecință a probabilității impactului clinic semnificativ asupra animalului care poate persista timp de câteva săptămâni, o clasificare prospectivă a severității de nivel **SEVER** este considerată adecvată.

Este posibil ca severitatea să fie MODERATĂ?

Posibilitatea reducerii severității la un nivel moderat depinde de obiectivul studiului. De exemplu, în cazul monitorizării frecvente și detaliate a animalelor și atunci când există potențialul aplicării de puncte finale timpurii (de exemplu, în momentul declanșării șchiopătării, după o perioadă de șchiopătare ușoară a unui singur membru sau în momentul utilizării de metode de imagistică *in-vivo* pentru detectarea modificărilor timpurii ale patologiei articulațiilor), ar putea fi posibilă clasificarea severității procedurii ca fiind MODERATĂ. Astfel de sacrificări timpurii (de exemplu, încheierea studiului în ziua 6 după procedura imagistică) pot fi posibile în proiectele care investighează modificările inflamatorii timpurii. Tratamentul profilactic (inițiat înainte de instalarea completă a artritei) cu agenți farmaceutici noi care au efecte antiinflamatorii puternice și care atenuează instalarea completă a artritei poate determina, de asemenea, o reducere a severității la un nivel **MODERAT**. Cu toate acestea, tipul de studiu ilustrat aici vizează evaluarea tratamentelor în cazul artritei instalate complet și, prin urmare, clasificarea severității rămâne cea **SEVERĂ**.

Este posibil ca severitatea să depășească limita superioară?

În conformitate cu articolul 15 alineatul (2) din directivă, „statele membre se asigură că o procedură nu este realizată în cazul în care aceasta presupune durere, suferință sau stres severe care pot să dureze mult timp și care nu pot fi ameliorate”. Prezentul studiu prezintă potențialul de a cauza o suferință severă timp de mai multe săptămâni, putând fi considerată de durată. În cazul în care artrita se instalează la toate cele patru membre, iar suferința animalului nu este ameliorată, studiul s-ar situa peste limita superioară de severitate și ar fi necesară îmbunătățirea semnificativă a acestuia sau invocarea „clauzei de salvagardare” (articolul 55 din directivă) și solicitarea autorizației din partea Comisiei. Cu toate acestea, în exemplul de față sunt aplicate măsuri pentru reducerea suferinței – ținându-se seama în același timp de obiectivul științific – inclusiv îmbunătățirea compoziției, a administrării și a alegerii adjuvantului care permite instalarea artritei doar la membrele posterioare, furnizarea unui mediu confortabil și acces ușor la hrană și apă, un sistem de monitorizare cuprinzător și puncte finale de sacrificare prin metode umane. Prin urmare, proiectul nu ar fi considerat ca depășind limita superioară și poate fi autorizat cu condiția unei evaluări pozitive a proiectului, inclusiv revizuirea prejudiciilor și a beneficiilor.

În cele ce urmează, este prezentat un exemplu de fișă de notare clinică pentru observarea zilnică a artritei la șobolani.

Data:	Ziua 1	Ziua 2	Ziua 3	Ziua 4
Aspect				
Greutatea corporală				
Lipsa îngrijirii				
Deshidratare				
Funcții fiziologice				
Dispnee				
Tahipnee				
Comportament				
Reticent la mișcare				
Letargie/apatie				
Imobilitate				
Vocalizare				
Indicator specific procedurii				
Notarea labei artrite (a se				

vedea tabelul 2)				
Alte observații				
(text liber)				
Punctaj total				

Notă: Fiecare indicator a fost evaluat în conformitate cu sistemele prezentate în tabelele 1 și 2 de mai jos. De exemplu, dacă cele două membre posterioare au fost notate cu 3 și, respectiv, 2, în dreptul criteriului „Lipsa îngrijirii” ar trebui inserat 1 (tabelul 1), iar în dreptul criteriului „Indicator specific procedurii” ar trebui inserat 5 (tabelul 2). Acțiunile și punctele finale stabilite mai jos iau în considerare cerința de a evita suferința severă, dacă este posibil, dar nu presupun sacrificarea prin metode umane a animalelor înainte de obținerea unor date suficiente, întrucât aceasta ar face necesară utilizarea de alte animale naive.

Tabelul 1. Sistem de notare a indicatorilor utilizați în fișa de notare clinică

	Punctaj
Aspect	
Normal, pierdere în greutate < 5 %	0
Pierdere în greutate de 5-10 %	1
Pierdere în greutate de 11-15 %	2
Pierdere în greutate de 16-20 %	3
Pierdere în greutate de 20 % +	HEP
Lipsa îngrijirii	1
Piele încrețită/deshidratare	1
Funcții fiziologice	
Dispnee	2
Tahipnee	1
Comportament	
Reticență la mișcare	1
Letargie/apatie	2
Imobilitate persistentă < 24h	3
Imobilitate >24h	HEP
Vocalizare în momentul manipulării	1
Vocalizare, tensionat și nervos în momentul manipulării	2
Vocalizare în momentul mișcării/spontană	3
Indicator specific procedurii	

Tabelul 2. Indicator specific procedurii – punctarea labei artritice

0	Normală
1	Eriteme și inflamarea unui glezne
2	Eriteme și inflamarea gleznei și a primei jumătăți a articulațiilor tarsale
3	Eriteme și inflamarea gleznei și a tuturor articulațiilor tarsale până la articulațiile metatarsale
4	Eriteme și inflamarea întregii labe, inclusiv a degetelor

Sistemul de punctare a poliartritei folosit ca indicator specific procedurii se bazează pe nivelurile crescute de inflamare și eriteme periarticulare. Punctajele se bazează pe examinare fizică și inspecție vizuală și sunt folosite pentru a calcula „un indice artritic” definit ca suma punctajelor obținute pentru ambele membre posterioare.

Notarea labei artritice (tabelul 2)	0-8
-------------------------------------	-----

HEP: Aplicarea punctului final de sacrificare prin metode umane, indiferent de prezența sau absența altor semne clinice

Exemple de intervenții adecvate ca răspuns la punctajele clinice totale

Acțiuni care trebuie întreprinse	Punctaj total
Creșterea frecvenței monitorizării; luarea în calcul a unui aport de lichide/îngrijire	≥4
Revizuirea progresului împreună cu medicul veterinar	5-15
Sacrificare printr-o metodă umană	≥16

Notă: Punctajele totale sunt preluate din fișele de punctare clinică, completate în conformitate cu sistemele de punctare prezentate în tabelele 1 și 2. De exemplu, un animal cu o pierdere în greutate de 12 %, care prezintă o îngrijire redusă și inflamare a ambelor glezne posterioare are un punctaj total de 5.

Evaluare retrospectivă:

36 de șobolani au fost imunizați cu collagen bovin tip II în adjuvant Freund incomplet (FIA). Toate animalele au dezvoltat artrită: punctarea labei artritice a fost de 6 până în Z10. Toate animalele au prezentat o pierdere în greutate cuprinsă între 5-10 %. Măsurătorile diametrului articulațiilor au indicat o modificare semnificativă în raport cu datele de referință. Observațiile clinice zilnice au inclus lipsa îngrijirii, reticența la mișcare, apatie, vocalizare la atingere (în timpul observației și al schimbării cuștii), alimentare scăzută și perioade de imobilitate.

- 12 animale au fost utilizate în grupul tratat cu soluție salină. Cele mai mari punctaje acordate labei artritice au fost cuprinse între 6 și 8 pentru toate măsurătorile (Z13, Z16, Z20 și Z24). Măsurătorile diametrului articulațiilor au indicat, de asemenea, creșteri semnificative în raport cu datele de referință de fiecare dată. Punctajele clinice s-au situat între 4 și 8 cu o pierdere în greutate cuprinsă între 5 % și 15 %, cu excepția unui animal care a prezentat o pierdere în greutate de 21 % în Z17 și care a fost sacrificat printr-o metodă umană.

Evaluare retrospectivă: SEVERĂ

- 12 animale au fost tratate cu MEDICAMENTUL A într-o doză **scăzută**. La toate animalele, punctajul labei artritice a fost același cu cel acordat pentru grupul tratat cu soluție salină până în Z16.

În Z20, un singur animal avea un punctaj al labei de 8, celelalte punctaje se situau între 6 și 7.

În Z24, cinci animale prezentau un punctaj al labei artritice ușor mai scăzut (5-7). Semnele clinice ale celor cinci animale au înregistrat o ușoară îmbunătățire, însă greutatea corporală a scăzut în continuare cu 5 % până la 10 %; de asemenea, mobilitatea acestora în cușcă a rămas scăzută.

Celelalte șapte animale nu au prezentat semne artritice și clinice reduse comparativ cu grupul tratat cu soluție salină.

Evaluare retrospectivă: SEVERĂ

- 12 animale au fost tratate cu MEDICAMENTUL A în doză **ridicată**. În Z13 punctajele pentru labele artritice erau cuprinse între 4 și 6; diametrele articulațiilor indicau, de asemenea, o scădere ne semnificativă. Printre semnele clinice se numărau lipsa îngrijirii și o pierdere în greutate < 10 %. În Z16, punctajele labelor artritice au scăzut la 4, iar diametrele articulațiilor au prezentat reduceri semnificative. Greutatea corporală s-a stabilizat în Z16. La unele animale a fost observată în continuare reticență la mișcare. Începând cu Z20, inflamația articulațiilor s-a redus la 2 și 4. Au fost observate comportamente normale în cușcă. Greutatea corporală a revenit la nivelurile de dinaintea procedurii.

Evaluare retrospectivă: SEVERĂ

Notă: Până la sfârșitul studiului, în cel de-al treilea grup de 12 animale, agentul de testare „MEDICAMENTUL A” administrat în doză **ridicată** s-a dovedit eficient în reducerea gradului real de severitate la nivelul moderat. Cu toate acestea, deoarece modelul presupunea instalarea completă a artritei la toate animalele înainte de începerea tratamentului, moment în care animalele au prezentat semne specifice clasificării severității la nivel „sever”, clasificarea gradului real de severitate pentru animale a rămas cea **severă**.

Întrucât proiectul implică proceduri severe, trebuie efectuate revizuirii permanente ale severității de către utilizator, în colaborare cu organismul pentru bunăstarea animalelor, tehnicianul veterinar și medicul veterinar desemnat, pentru a sigura faptul că cei trei R sunt aplicați constant.

Exemple pentru ilustrarea procesului de evaluare a severității

Modelul 4 – Accident vascular cerebral

Ultima actualizare:05/02/2013

Context general

Accidentul vascular cerebral este definit ca o pierdere sau o alterare a funcției fiziologice normale rezultată dintr-o aprovizionare insuficientă cu sânge a unei părți a creierului. În pofida unei mai bune înțelegeri a patofiziologiei afecțiunilor vasculare cerebrale, tratamentul eficient al accidentelor vasculare cerebrale rămâne în continuare o necesitate medicală neîndeplinită, iar cercetările în derulare vizează identificarea unor măsuri preventive și terapeutice adecvate.

Trei tipuri diferite de accidente vasculare cerebrale pot fi observate la pacienții umani: accident vascular cerebral ischemic, hemoragie intracerebrală și hemoragie subarahnoidiană, dar majoritatea modelelor animale disponibile în prezent se bazează pe tipul ischemic. Modelele accidentelor vasculare cerebrale, prin însăși natura acestora, reprezintă o provocare din perspectiva bunăstării animalelor. O bună interacțiune și comunicare între toți cei implicați în procedurile științifice (medici veterinari, cercetători, tehnicieni veterinari și personal de îngrijire) este esențială pentru a se asigura că există un echilibru adecvat între atingerea unui model valid în acest domeniu de cercetare și reducerea la minimum a suferinței animalelor.

Accidentul vascular cerebral este indus în mod curent la rozătoare prin blocarea temporară sau permanentă a arterei cerebrale medii (ocluzie a arterei cerebrale medii; modelul MCAO). Modelul „MCAO” vizează reproducerea în mod experimental a ischemiei cerebrale focale care are loc în accidentele vasculare cerebrale și a fost folosit în mod extensiv pentru a studia mecanismele de afectare, pentru a identifica potențiale ținte și pentru a testa agenți neuroprotectivi putativi. Au fost identificate diferențe între sușe la șoareci și șobolani, precum și influența complexă și semnificativă a vârstei, a sexului și a comorbidităților precum diabet, hipertensiune și ateroscleroză. În timp ce cercetările preclinice în domeniul atacurilor vasculare cerebrale recurg deseori la rozătoare mascul tinere și sănătoase, impactul factorilor de tipul celor menționați mai sus poate fi explorat folosind modele prezentând comorbiditate (de exemplu, șobolani cu hipertensiune spontană, diabet indus cu streptozotocină (STZ) la șobolani). În astfel de cazuri cu comorbiditate, ar putea fi necesare observații mai atente ale semnelor clinice și puncte finale de sacrificare prin metode umane mai timpurii (HEP).

Într-un concept de studiu standard, animalele sunt antrenate să efectueze anumite teste comportamentale anterior procedurii MCAO. Pe durata perioadei terapeutice, stabilită în conformitate cu mecanismul de acțiune a medicamentelor și obiectivul studiului, animalelor li se administrează compusul testat. Analiza rezultatelor ar trebui să includă informații privind dimensiunea infarctului, rata de mortalitate, frecvența complicațiilor

(de exemplu, hemoragie subarahnoidiană), împreună cu evaluarea funcțională și neurologică pentru monitorizarea progresului. Imagistica cu rezonanță magnetică (MRI) în serie s-a dovedit un instrument important pentru obținerea de informații cu privire la variația dimensiunii infarctului în timp, dar aceasta poate furniza, de asemenea, informații suplimentare cu privire la fluxul sanguin sau starea metabolică. Pot fi incluse, de asemenea, puncte finale histologice, biochimice și moleculare.

Există mai multe teste comportamentale care pot fi aplicate în cazul modelelor de accidente vasculare cerebrale. Cele mai simple metode includ sisteme de punctare neurologică care evaluează starea neurologică globală și teste de plasare a membrelor utilizate pentru a măsura reflexele motorii. Acestea sunt utilizate, în general, pentru a evalua animalele în etapa acută ulterioară accidentului vascular cerebral. În studiile pe termen lung, pot fi folosite teste mai complexe pentru a evalua funcțiile senzoriale și motorii (de exemplu, testul cu etichetă adezivă bilaterală, deplasare pe grindă, tijă rotativă sau scări) și funcțiile cognitive precum memoria (de exemplu, teste de evitare pasivă sau evaluări ale strategiilor de învățare).

O bună practică în materie o reprezintă efectuarea unui grup de teste comportamentale, inclusiv cel puțin unul pentru fiecare etapă (acută și pe termen lung) astfel încât să se culeagă informații cuprinzătoare cu privire la impactul asupra funcțiilor senzoriale, motorii și cognitive. Testele trebuie alese cu grijă pentru a capta toate efectele strategiilor terapeutice putative. Nu sunt incluse aici descrieri detaliate ale fiecăruia dintre testele comportamentale, și nici a regimurilor de instruire, dar pentru o trecere în revistă și discuții cuprinzătoare cu privire la folosirea acestora, a se vedea Schaar et al. (2010).

Referințe

- Braeuninger S and Kleinschnitz C. Recent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2009 Nov; 1:8.
- Freret T and Bouet V. Improvements of the Stroke Model Guidelines – Animal body weight and long-term functional concerns. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2009; 2(2): 28-31
- Graham SM et al. Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care. *Comparative Medicine*, 2004 Oct; 54(5): 486-496
- Yanamoto H et al. Evaluation of MCAo stroke models in normotensive rats: standardized neocortical infarction by the 3VO technique. *ExpNeurol*, 2003 Aug; 182(2):261-74
- Liu S et al. Rodent stroke model guidelines for preclinical stroke trials (1st edition). *Journal of experimental stroke and translational medicine*, 2009 Jan 1;2(2):2-27.
- Schaar KL et al. Functional assessments in the rodent stroke model. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2010; 2: 13; open access at <http://www.etsmjournals.com/content/2/1/13>

- Virley et al. A temporal MRI assessment of neuropathology after transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlations with behaviour. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000;20: 563-582.

Studiu

Eficacitatea unui nou agent terapeutic asupra firului intraluminal în modelul ocluziei arterei cerebrale medii (MCAO) la șobolani

În acest exemplu, 40 de șobolani tineri masculi de tip Sprague-Dawley (300-350g) vor fi supuși unei proceduri MCAO permanente folosindu-se tehnica filamentului intraluminal sub anestezie generală. Șobolani vor fi distribuiți aleatoriu (n=10/grup) pentru a primi fie vehicul (10ml/kg), fie un nou agent test (compus A) la 1, 3 sau 10 mg/kg, administrat intravenos într-o venă de la nivelul cozii timp de o oră după 30 de minute de la MCAO. Dozele ulterioare (vehicul sau compus A la 1, 3 sau 10 mg/kg) vor fi administrate intra-peritoneal la 6 și 24h de la MCAO. Șobolani vor fi inițial adăpostiți în perechi în cuști solide prevăzute cu podea cu așternut gros și materiale pentru cuib. Hrana va fi restricționată înainte de perioada de instruire pentru a facilita performanța la testul pe scară, o sarcină motivată de apariția senzației de foame. Animalele vor dispune de hrană *ad libitum* timp de 6 ore anterior intervenției chirurgicale și timp de 6 zile ulterior MCAO pentru a îmbunătăți luarea în greutate și recuperarea post-operatorie.

Rezultatele funcționale vor fi evaluate zilnic cu ajutorul unui sistem de punctare neurologică (scara Bederson; a se vedea Schaar et al. 2010) și al testelor comportamentale (eticheta adezivă bilaterală și deplasarea pe bârnă); Testul pe scară va fi, de asemenea, efectuat zilnic începând cu ziua 7 ulterioară MCAO, pentru a permite un timp suficient pentru recuperarea post-operatorie înainte de reintroducerea restricției alimentare. Nu se așteaptă ca testele comportamentale să cauzeze o suferință semnificativă. Imagistica prin rezonanță magnetică (MRI) va fi efectuată pe șobolani anesteziați în zilele 1, 7, 14 și 28 pentru a evalua volumul leziunilor. Toate animalele vor fi sacrificate după 28 de zile de la MCAO.

Evaluarea prospectivă inițială și analiza unor îmbunătățiri specifice și a unor puncte finale de sacrificare prin metode umane

Ce acțiuni asupra animalelor presupune studiul?	Ce vor experimenta animalele? Câtă suferință ar putea fi cauzată? Ce ar putea să o înrăutățească?	În ce mod va fi redusă la minimum suferința?	
	Efecte adverse	Metodologie și intervenții	Puncte finale de sacrificare
Instruire preoperatorie în cadrul testelor comportamentale pe o perioadă de 2-3 săptămâni: testul cu eticheta adezivă bilaterală (pentru lipsa de atenție contra-laterală), deplasarea pe bârnă (pentru coordonarea membrelor posterioare) și testul pe scară (pentru folosirea competentă a labelor membrelor anterioare)	Un nivel minim de stres/anxietate poate fi cauzat înainte de obișnuirea animalelor cu mediul de testare, întrucât testarea implică mutarea animalelor în încăperi/ringuri noi	Obișnuirea progresivă cu echipamentele de testare Manipulare calmă, empatică.	Eliminarea din sesiunea de instruire dacă sunt observate semne de suferință Animalele care nu ating o performanță de referință într-un timp prestabilit vor fi excluse din studiu
Restricționarea hranei (85-90 % din cantitatea de hrană la dispoziție) pre-operator și din ziua 7 de la MCAO pentru a facilita performanța la testul pe scară	Înfometare ușoară; posibilă frustrare și anxietate	Pierderea în greutate nu va depăși 10 %, în caz contrar restricționarea hranei va fi suspendată	Dacă sunt observate probleme comportamentale cauzate de lipsa aportului de hrană, animalele vor fi excluse din studiu
Sub anestezie generală, ocluzie tranzitorie (90 min) a arterei cerebrale medii cu ajutorul unui filament intraluminal introdus prin artera carotidă comună	Durere și disconfort asociate intervenției chirurgicale Posibile complicații chirurgicale neașteptate, de exemplu, hemoragie	Utilizarea de anestezice adecvate și cu efect aversiv minim cu analgezice adecvate (și anume, eficiente însă cu proprietăți neuroprotective minime)	Animalele vor fi sacrificate printr-o metodă umană dacă survine oricare dintre următoarele –

	<p>subarahnoidiană, afecțiuni retinală ipsilaterală, formare de trombi intraluminali, edeme cerebrale, implicarea hipotalamusului rezultând hipertermie sau necroză musculară temporală. Acestea se pot prezenta în mai multe moduri diferite, de exemplu prăbușire bruscă, paralizie, înclinații severe ale capului, crize</p> <p>Aversiune și posibile efecte ale anesteziei asupra variabilelor fiziologice (precum, hipotermie, hipotensiune, hipoxie)</p> <p>Aport nutrițional scăzut rezultat din nivelul redus de conștiență, masticăție deficitară și motilitate redusă, în general în primele 48h de la MCAO</p> <p>Gradul de deficit locomotor care ar putea cauza stres și/sau frustrare</p>	<p>Chirurg bine instruit folosind o tehnică chirurgicală aseptică adecvată (cu revizuri regulate ale ratelor de succes)</p> <p>Menținerea homeostazei pe durata anesteziei</p> <p>Utilizarea monofilamentelor și a tehnicii chirurgicale standardizate pentru a reduce variabilitatea și complicațiile rezultate din leziunile extinse</p> <p>Îngrijire postoperatorie intensivă pentru primele 3-5 zile, inclusiv surse de căldură externe</p> <p>Controale regulate ale greutateii corporale; observarea și îngrijirea zilnică a plăgii</p> <p>Furnizarea de hrană și apă ușor accesibile pe durata perioadei de recuperare sau hrană suplimentară (hrană terciuită, lichide) și asistență în vederea hrănirii dacă este necesar; rehidratare (de exemplu, prin injectarea de soluție salină), dacă este necesar</p>	<ul style="list-style-type: none"> • probleme tehnice semnificative în timpul intervenției chirurgicale • nerevenirea completă din anestezie • semne de complicații chirurgicale neașteptate • dacă pierderea în greutate a animalului depășește 20 % din greutatea preoperatorie, în pofida hrănirii suplimentare și/sau a rehidratării sau dacă acestea rămân imobile mai mult de 24 de ore
--	---	--	---

<p>Teste comportamentale (testul cu eticheta adezivă bilaterală și testul de deplasare pe bârnă) întreprinse zilnic din 1 până în ziua 28 de la MCAO; testul pe scară este efectuat zilnic începând cu ziua 7 de la MCAO</p>	<p>Este posibil ca animalele să resimtă sarcinile ca fiind stresante dacă abilitățile lor motorii au fost afectate</p>	<p>Monitorizarea indicatorilor comportamentali de anxietate sau suferință Animalele vor fi observate în permanență de către personal cu experiență</p>	<p>În mod obișnuit, este stabilit un timp maxim pentru efectuarea sarcinii solicitate și este acordat un punctaj final</p>
<p>Administrarea noului agent terapeutic pe cale s.c/ i.v/ i.p. înainte și/sau după intervenția chirurgicală (profilactic/terapeutic)</p>	<p>Disconfort tranzitoriu asociat căii de administrare Nu se așteaptă efecte adverse la dozele administrate</p>	<p>Administrare în conformitate cu bunele practici folosind calea de administrare și tehnicile cel mai puțin dureroase/traumatizante posibil în concordanță cu obiectivele științifice. Animalele vor fi observate îndeaproape în vederea identificării efectelor adverse ale substanțelor de test</p>	<p>Animalele vor fi sacrificate printr-o metodă umană dacă sunt notate efecte secundare severe cauzate de noii agenți terapeutici</p>
<p>MRI longitudinală sub anestezie în zilele 1, 7, 14 și 28 de la MCAO</p>	<p>Anestezie repetată Aversiune și posibile efecte ale anesteziei asupra variabilelor fiziologice (precum hipotermie, hipotensiune, hipoxie)</p>	<p>Utilizarea de anestezice adecvate cu efect aversiv minim Menținerea homeostazei pe durata anesteziei, inclusiv terapia cu lichide înaintea sau pe durata acesteia dacă sunt probleme legate de deshidratare și încălzire pentru a menține normotermia</p>	<p>Animalele care nu-și revin complet din anestezie vor fi sacrificate Animalele vor fi sacrificate printr-o metodă umană dacă homeostaza nu poate fi menținută în urma recuperării</p>

Analiză

Modelul este considerat SEVER din cauza procedurii chirurgicale implicate, a efectelor adverse (dar, de regulă, tranzitorii) ale MCAO asupra bunăstării animalului și a posibilității unor complicații perioperatorii semnificative. Cu toate acestea, impactul negativ asupra bunăstării animalului poate fi redus prin îngrijire postoperatorie intensivă în primele 48h și o monitorizare atentă a etapei următoare – cu luarea de acțiuni prompte dacă apar probleme. Din punct de vedere experimental, atenția acordată modalităților de îmbunătățire și standardizarea fiecărei proceduri individuale pot conduce la o incidență redusă a complicațiilor și a variabilității și, prin urmare, la o mai bună calitate a datelor și o reducere a numărului de animale folosite.

Prin urmare, o clasificare prospectivă a severității de nivel SEVER este adecvată.

Este posibil ca severitatea să fie MODERATĂ?

Deși severitatea prospectivă a modelului ar trebui să fie întotdeauna SEVERĂ din motivele subliniate mai sus, incidența efectelor severe poate fi redusă prin acțiunea operatorilor experimentați, împreună cu supravegherea veterinară de specialitate și îngrijirea animalelor și intervenții timpurii convenite în cazul în care apar complicații. O severitate MODERATĂ ar putea fi autorizată în unele situații, dar numai punctual pentru grupuri de cercetare individuale care au un istoric dovedit în materie de experiență în legătură cu acest model particular și este cunoscută capacitatea acestora de a utiliza modelul fără a cauza un nivel de suferință peste nivelul moderat.

Observații clinice

Animalele sunt monitorizate cu cea mai mare grijă în etapa postoperatorie. Analgezicele și terapia de susținere la nivel local sunt furnizate în măsura în care sunt necesare.

La sfârșitul exemplului este inclus un model de sistem combinat de punctare neurologică/clinică utilizat pentru a contribui la monitorizarea condiției clinice a animalelor pe durata procedurii.

Rezultate

Toate animalele, cu excepția unuia din grupul tratat cu vehicul, s-au recuperat în urma intervenției chirurgicale, fără complicații neașteptate, datorită sprijinului perioperator intensiv acordat.

- Toate cele 10 animale tratate cu vehicul au obținut cel mai mic punctaj neurologic pe durata studiului, însoțit de o performanță slabă în cadrul testelor comportamentale comparativ cu animalele tratate. Punctajul clinic a fost similar celui al animalelor tratate în perioada imediat următoare efectuării MCAO (primele 48 de ore), ulterior fiind înregistrate diferențe în rândul animalelor din grupul tratat cu vehicul:
 - 1 din 10 a trebui să fie sacrificat în ziua 2 post-operator ca urmare a unei pierderi în greutate de >20 % (în pofida alimentației adiționale și a rehidratării).
Evaluare: SEVER
 - 6 din 10 au dezvoltat un deficit neurologic moderat, dar au prezentat o îmbunătățire minimă a punctajului clinic în timp.
Evaluare: SEVER
 - 3 din 10 animale au dezvoltat un deficit neurologic moderat și au prezentat o reducere graduală a punctajului clinic în timp, rezultat posibil din abilitatea acestora de a compensa și de a se adapta la deficiturile neurologice pe termen lung.
Evaluare: MODERAT
- Toate cele 20 de animale tratate cu compusul A în doze mai mici (1 și 3 mg/kg) au prezentat o îmbunătățire a punctajului neurologic la 48 de ore de la MCAO împreună cu o îmbunătățire a punctajului clinic.
Evaluare: MODERATĂ
- Toate cele 10 animale tratate cu compusul A în doza cea mai mare (10 mg/ kg) au prezentat o îmbunătățire a punctajului neurologic comparativ cu grupul tratat cu vehicul la 24 de ore de la MCAO, doar o pierdere în greutate mică (5 %) la 24 de ore de la intervenția chirurgicală și o îmbunătățire semnificativă a punctajului clinic la 48 de ore de la MCAO.
Evaluare: MODERATĂ

Evaluarea gradului real de severitate

7 animale au fost considerate ca suportând un grad de severitate **SEVER**; 33 de animale au suportat un grad de severitate **MODERAT**

Sistemul de punctare

Evaluarea severității este realizată printr-o combinație de observații clinice generale (greutate corporală, aspect, comportament, mediul din cușcă), împreună cu o evaluare neurologică specifică procedurii. Scara Bederson este o evaluare neurologică globală elaborată pentru a măsura deficitul neurologic în urma unui accident vascular cerebral. Se utilizează o scară de notare de 0-3, unde 0=normal și 3=cel mai ridicat nivel de dizabilitate. Testele includ flexiunea membrilor anteriori, rezistența la împingere laterală și mișcare circulară.

gradul 0: niciun deficit observabil

gradul 1: flexiunea membrilor anteriori

gradul 2: rezistență scăzută la împingere laterală (și flexiunea membrilor anteriori) fără mișcare circulară

gradul 3: același comportament precum cel de gradul 2, cu mișcare circulară

HEP: punct final de sacrificare prin metode umane

	Punctaj
Aspect	
Pierdere în greutate de 5-10 %	1
Pierdere în greutate de 11-15 %	2
Pierdere în greutate de 16-20 %	3
Pierdere în greutate de + 20 %	HEP
Blană ușor neîngrijită	1
Pilozitate ușoară	2
Pilozitate accentuată	3
Comportament	
Mers ușor anormal	1
Mers accentuat anormal	2
Probleme de mobilitate semnificative	3
Imobilitate >24h	HEP
Încordat și nervos în timpul manipulării	2
Într-o suferință semnificativă în momentul manipulării, de exemplu, tremur, vocalizare, agresiv	3

Acțiuni	
Punctaj 1	Revizuirea frecvenței monitorizării
4	Furnizarea de îngrijire suplimentară, de exemplu, aport de lichide și alimente sub formă lichidă terciuite
5	Revizuirea progresului împreună cu medicul veterinar
12	Aplicarea unei punct final de sacrificare prin metode umane

Mediu	
Cuib ușor dezorganizat	1
Cuib care cu greu poate fi recunoscut	2
Fără cuib	3
Punctaj neurologic	
Flexiunea membrelor anterioare	1
Rezistență scăzută la împingere laterală (și flexiunea membrelor anterioare) fără mișcare circulară	2
Același comportament precum cel de gradul 2, cu mișcare circulară	3

Ațiuni – Trebuie notat faptul că, întrucât complicațiile chirurgicale sunt observate, în general, imediat în perioada de recuperare postoperatorie, monitorizarea atentă și competență și aprecierea empatică sunt esențiale în primele 24 de ore pentru a se asigura faptul că sunt identificate efectele adverse și sunt luate măsuri pentru abordarea acestora și că animalele sunt sacrificate printr-o metodă umană în cazul în care suferința lor depășește nivelul sever.

Exemplu de fișă de observație individuală (zilele 0-4)

Ziua	0	1	2	3	4
Aspect					
Greutate corporală(g) (punctaj)	320 (0)	292 (1)	285 (2)	287 (1)	292 (1)
Starea blănii					
Blană neîngrijită/pilozitate	1	1	0	1	0
Comportamente					
Mers	3	2	2	2	1
Răspuns la manipulare	0	0	2	0	0
Mediu					
Starea cuibului	3	2	1	0	0
Punctaj neurologic specific	2	2	1	1	1

procedurii					
Punctaj total	9	8	8	5	3
Volumul leziunilor (evaluare MRI)*		11 %			
<u>Alte observații</u>	Recuperat fără evenimente în urma intervenției chirurgicale, fără complicații Dozat la 30 de minute și la 6 ore	Se deplasează prin cușcă și a încercat să facă un cuib	Teste comportamentale, anxios la început, dar finalizate toate, cuib mai structurat	Blană mai puțin îngrijită azi, dar greutatea este stabilă, iar cuibul este structurat	Teste comportamentale finalizate, mai puțin anxios, mers îmbunătățit în mod semnificativ

* „volumul leziunilor” (evaluat cu ajutorul MRI) este inclus pentru ca cercetătorul să îl completeze la sfârșitul studiului. Datele pot fi ulterior corelate cu observațiile clinice și comportamentale astfel încât să se poată efectua îmbunătățiri suplimentare ale monitorizării și îngrijirii animalelor și ale procedurilor.

Exemple pentru ilustrarea procesului de evaluare a severității Modelul 5 – Producere de anticorpi policlonali la șoarece

Ultima actualizare: 05/02/2013

Context general

Obiectivul principal al producerii de anticorpi la animalele de laborator este de a obține antiseruri cu un titru ridicat și un grad ridicat de afinitate pentru uz experimental sau în cadrul testelor de diagnosticare.

O mare parte din biologia și biochimia modernă se bazează pe disponibilitatea de anticorpi foarte specifici pentru a fi utilizați într-o varietate de tehnici precum imunohistochimie, ELISA, imunoprecipitare și immunoblotting. Astfel, generarea de cantități mari de anticorpi specifici direcționați către proteine sau peptide de interes este esențială pentru succesul multor programe de cercetare de bază sau aplicată.

În acest exemplu, este folosit un iepure pentru a forma anticorpi la peptide mici considerate importante în regularizarea diviziunii celulare, ca parte a unui program de cercetare implicând studii biochimice ale diviziunii celulare la mamifere.

Referințe

- Canadian Council on Animal Care guidelines on; antibody production (2002). Disponibil la adresa http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Antibody_production.pdf
- EFPIA/ECVAM (Diehl K-H et al.) (2001) A good practice guide to the administration of substances and the removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* **21**: 15-23
- JWGR (2001) Refining procedures for the administration of substances. *Laboratory Animals* **35**: 1-41
- Keating SCJ, Thomas AA, Flecknell PA & Leach MC (2012) Evaluation of EMLA cream for preventing pain during tattooing of rabbits: changes in physiological, behavioural and facial expression responses. *PLOS ONE* **7(9)**: e44437 (acces liber, <http://www.plosone.org>)
- Leenars M, Hendriksen CFM (2005) Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendation. *ILAR Journal*. **46**:269-279
- Stills HF (2005) Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR Journal*. **46**:280-293
- UFAW/RSPCA (2008) *Refining Rabbit Care: A Resource for Those Working With Rabbits in Research*. Southwater, UK: RSPCA (disponibil gratuit la adresa <http://www.rspca.org.uk/researchrabbits>)

Studiul

Din experiența anterioară s-a stabilit că un singur iepure ar trebui să furnizeze suficient material pentru fiecare peptidă studiată. Iepurele va fi adăpostit într-un țarc pe podea într-un grup stabil de iepuri compatibili (folosiți, de asemenea, pentru producere de anticorpi), dotată cu un spațiu adecvat pentru îmbunătățire, exerciții și comportament social normal (UFAW/RSPCA 2008). Animalul va fi imunizat cu un amestec de antigen/adjuvant. La momente prestabilite, vor fi recoltate cantități mici de sânge pentru a se stabili dacă imunizarea s-a realizat cu succes. În momentul în care se obține un titru adecvat de anticorpi, animalul este exsanguinizat sub anestezie profundă fără recuperare pentru colectarea anticorpilor din sânge.

Manipularea iepurilor poate fi stresantă și ar trebui efectuată numai de către personal competent și empatic. Comportamentul iepurelui poate fi dificil de interpretat și o bună practică constă în cunoașterea literaturii de specialitate referitoare la comportamentul și bunăstarea iepurilor. De exemplu, literatura recentă a indicat faptul că iepurii pot afișa „expresiile faciale ale durerii” în anumite circumstanțe (Keating et al. 2012), iar potențialul utilizării acestora ca instrument de evaluare a bunăstării ar trebui examinat de la caz la caz.

Din cauza imunogenicității scăzute a peptidelor cu catenă scurtă, este necesară administrarea acestora în combinație cu un adjuvant. Adjuvantul Freund complet (FCA) a fost utilizat anterior, dar, în prezent, sunt disponibili adjuvanți sintetici care sunt, de asemenea, eficienți în această procedură, prezentând un grad minim de iritare.

Evaluare prospectivă inițială și analiza unor îmbunătățiri specifice și a unor puncte finale de sacrificare prin metode umane

Ce acțiuni asupra animalelor presupune studiul?	Ce vor experimenta animalele? Câtă suferință ar putea fi cauzată? Ce ar putea să o înrăutățească?	În ce mod va fi redusă la minimum suferința?	
	Efecte adverse	Metodologie și intervenții	Puncte finale de sacrificare
Imunizare cu antigen și adjuvant; trei injecții subcutanate în zilele 8, 22 și 37	Disconfort în urma injectării Pot apărea umflături nedureroase ca răspuns la administrarea adjuvantului Posibilitate (rară) de ulcerare la locul injectării	Volumul, compoziția și frecvența injecțiilor vor fi în conformitate cu orientările privind bunele practici (de exemplu, EFPIA/ECVAM sau JWGR), în mod obișnuit un număr maxim de patru locuri și 0,25	Animalul va fi sacrificat printr-o metodă umană dacă există semne de disconfort, durere sau suferință prelungită (de exemplu, atenție constantă

		ml/loc Toate ulcerele vor primi imediat tratament veterinar adecvat	asupra locului injectării sau umflături) sau în cazul în care formele de ulcer nu se vindecă
Prelevare de mostre de sânge pentru evaluarea răspunsurilor anticorpilor (maximum 5)	Capturarea, manipularea și reținerea care pot fi stresante Disconfort minor asociat înțepăturii de ac Risc scăzut de hemoragie sau de formare de hematoame	Prelevarea se face dintr-o venă superficială (ureche). Cantități mici de sânge (<5ml) prelevate numai pentru a se verifica titrul anticorpilor Aplicarea de presiune la locul prelevării	Dacă animalul devine excesiv de stresat din cauza procedurii, prelevarea va fi amânată până când comportamentul animalului revine la normal
Exsanguinare sub anestezie generală	Disconfort minor și posibilă aversiune la agent pe durata inducerii anesteziei	Utilizarea unui agent anestezic cu un nivel aversiv minim	Animalul rămâne sub anestezie până la deces

Analiză

Se așteaptă doar o severitate de nivel superficial, datorită îmbunătățirilor în ceea ce privește creșterea și îngrijirea, aplicării de bune practici în administrare și prelevare și alegerii unui adjuvant cu un grad minim de iritare.

Prin urmare, o clasificare prospectivă a severității de nivel SUPERFICIAL este adecvată.

Este posibil ca procedura să fie îmbunătățită?

Potențialul de utilizare a unor adjuvanți cu un grad minim de iritare și a unor agenți anestezici mai puțin aversivi ar trebui revizuit în mod regulat prin consultarea literaturii de specialitate și prin discuții cu colegii pe marginea subiectului. Ar putea fi instituit un program de obișnuire a iepurilor tineri cu manipularea, pentru a reduce și mai mult stresul (UFAW/RSPCA, 2008).

Observații clinice

Deoarece în cadrul studiului sunt așteptate doar efecte adverse minore, a fost folosit un sistem de monitorizare de bază, și anume, animalele au fost verificate zilnic, iar observațiile au fost înregistrate, dar nu a fost considerată necesară o fișă de înregistrare structurată.

Un exemplu ilustrativ de fișă de observație este inclus la sfârșitul acestui exemplu.

Evaluarea gradului real de severitate

A fost înregistrată o inflamare ușoară, tranzitorie la nivelul unei zone de injectare, dar nu a fost necesar tratament. Iepurele a acordat o oarecare atenție locurilor de injectare pentru o scurtă perioadă de timp, dar se consideră că acest lucru a indicat doar un disconfort superficial. Nu au fost observate „expresii faciale ale durerii”.

Nu au fost notate efecte adverse cauzate de prelevarea efectivă a mostrelor de sânge din vena de la nivelul urechii.

În cazul animalului respectiv, s-a considerat adecvat un grad real de severitate de nivel **SUPERFICIAL**.

Exemplu de fișă de observare

Producere de anticorpi la iepure – Procedură & Fișă de observație		
Data	Greutatea corporală (kg)	Observații
01.03	3,5	Sângerare prealabilă - 5ml venă de la nivelul urechii; nu sunt observate efecte adverse
02.03		Nu sunt depistate anomalii (NAD)
06.03		NAD
07.03		NAD
08.03	3,6	Imunizat – 0,25ml x 2 locuri s.c., atenție ușoară acordată locurilor (țesălare) timp de câteva minute, apoi revenire la normal
09.03		NAD

10.03		NAD
11.03		NAD
12.03		Umflare ușoară, nedureroasă la locul LHS
13.03		Umflat în continuare la locul LHS, fără înrăutățire
14.03		Umflătura la locul LHS este încă prezentă, dar nu este dureroasă la palpare
15.03	3,6	Umflătura s-a retras, totul este normal
21.03		NAD
22.03	3,6	Imunizat – 0,25ml x 2 locuri s.c., atenție scurtă acordată locurilor
28.09		NAD
29.03	3.7	NAD
30.03		Test de sânge – 2ml vena de la nivelul urechii, fără efecte adverse
05/04		NAD
06/04	3.6	Imunizat – 0,25ml x 2 locuri
14/04	3.6	NAD
15/04		Test de sânge – 2ml vena de la nivelul urechii, fără efecte adverse
26/04		NAD
27/04	3.6	Exsanguinare sub anestezie generală, fără efecte adverse

Trebuie păstrate confirmările faptului că animalul a fost verificat cel puțin o dată pe zi – de exemplu, în fișa individuală a animalului (ca mai sus) sau în fișa încăperii.

Exemple pentru ilustrarea procesului de evaluare a severității

Modelul 6 – Producerea și menținerea de animale modificate genetic (MG)

Ultima actualizare:05/02/2013

1. Context general

Utilizarea de animale modificate genetic (MG) în cercetare a contribuit la înțelegerea funcțiilor genelor și ale proteinelor corespondente ale acestora. Diferitele fenotipuri pot avea o varietate de efecte asupra bunăstării animalelor, unele putând cauza durere, suferință sau anxietate. În timp ce unele fenotipuri și rezultate sunt previzibile, pot apărea numeroase caractere neașteptate sau secundare în timpul creării liniilor MG, astfel încât nu este posibilă întotdeauna estimarea cu exactitate a severității. În practică, la numeroase linii MG fenotipul nu este afectat și pot fi stabilite protocoale de evaluare pentru a se asigura faptul că fenotipurile adverse pot fi depistate. În mod alternativ, fenotipul așteptat poate fi deseori asociat cu fenotipuri secundare neprevăzute care se manifestă în momente diferite și pot fi afectate de diferiți factori de mediu.

În momentul evaluării prejudiciului real adus animalului, ar trebui să se țină seama de mai mulți factori precum tipul de mutație, genotip, fenotip și strategia de reproducere (de exemplu, evitând fenotipurile homozigote dăunătoare prin împerecherea de heterozigoți x tip sălbatic), împreună cu natura oricăror proceduri științifice sau de creștere adiționale și potențialele efecte ale acestora. Observațiile sistematice și oportune atât în timpul evoluției unei colonii, cât și pe durata etapei experimentale a unei colonii sunt necesare pentru o evaluare eficientă a stării de bunăstare a animalului.

Liniile noi ar trebui monitorizate cu atenție și supuse unei evaluări standard a bunăstării. Toate liniile ar trebui evaluate individual de către personal competent și instruit în mod adecvat în timpul evoluției și menținerii coloniei, iar informațiile cu privire la efectele adverse specifice observate ar trebui colaționate și raportate. Personalul autorizat ar trebui să aplice toate procedurile științifice implicate și, împreună cu personalul de îngrijire, ar trebui să monitorizeze și să înregistreze toate efectele asupra animalelor. Prospectiv, ar trebui stabilite puncte finale de sacrificare prin metode umane în raport cu parametri precum greutate corporală, condiția corporală și comportamente care constituie motive de preocupare, împreună cu caracteristici specifice de dezvoltare. Niciun animal nu ar trebui ținut în viață dacă se depășește gradul de severitate estimat, cu excepția cazului în care acest lucru prezintă un interes științific temeinic și doar cu autorizație din partea autorității competente.

Natura, momentul și durata observațiilor vor depinde de un număr de factori alții decât mutația aplicată. De exemplu, fondul genetic și condițiile de mediu în care sunt menținute animalele pot modifica semnificativ prezența fenotipului. Factorii specifici ar trebui notați cu exactitate pentru a facilita realizarea de comparații mai pertinente între facilități și monitorizarea animalelor MG în general. Durata de viață a fiecărei linii din

cadrul unei anumite facilități ar trebui, de asemenea, avută în vedere deoarece unele fenotipuri se instalează târziu, prin urmare, acestea vor putea fi observate numai dacă animalele sunt menținute pe perioade mai mari.

Referințe

RSPCA GA Passport Working Group (2010) *GA Passports: The Key to Consistent Animal Care*. Southwater, UK: RSPCA (disponibil la adresa <http://www.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals/implementing3rs/gapassport>)

Wells DJ et al (2006) *Assessing the welfare of genetically altered mice* *Laboratory Animals* **40(2)**: 111-114 (disponibil la adresa <http://www.nc3rs.org.uk/downloaddoc.asp?id=356&page=231&skin=0>)

2 Exemple

Cele trei exemple prezentate în secțiunile 2.1-2.3 de mai jos ilustrează modul în care poate fi evaluată severitatea la șoareci modificați genetic, inclusiv examinarea stadiilor de dezvoltare, impactul procedural și dezvoltarea coloniei. Fiecare exemplu se axează pe principiile evaluării severității mai degrabă decât pe luarea în considerare a fiecărui scenariu posibil pe durata dezvoltării coloniei.

Crearea fiecărui model va respecta proceduri standardizate, necesitând pregătirea chirurgicală a masculilor vasectomizați, manipularea embrionilor și implantarea chirurgicală a acestora la femele primitoare pseudo-gestante. Se presupune aplicarea bunelor practici în materie de asepsie, gestionarea durerii și competența chirurgului.

Confirmarea prezenței la urmașul derivat din fondator sau din linie de gemeni va fi stabilită din mostre de țesut obținute ca produs secundar de identificare (crestare la nivelul urechii) sau prin metoda cea mai puțin invazivă prin care se poate obține țesut suficient pentru evaluarea genotipului. Strategia de fenotipare pentru fiecare linie va depinde de genă, domeniul de cercetare și efectele estimate. Evaluarea severității va fi determinată de o serie de observații standardizate.

2.1 Model de șoarece modificat genetic – *GeneA*^{tm1a(Funding)Lab}

2.1.1 Context general

O colonie de șoareci a fost creată cu o mutație nouă a *GeneA* care a vizat o linie de celule stem embrionare derivată pe fondul C57BL/6N cu un potențial fenotipic necunoscut. Modelul a fost menținut pe un fond definit (C57BL/6N). Din momentul în care s-a realizat transmiterea liniei de

germeni a șoarecilor G1, s-a efectuat un screening de bază al evaluării bunăstării folosindu-se 30 de pui din 3-5 fătări rezultate din împerecheri independente. Puii au fost monitorizați în stadii stabilite de dezvoltare a coloniei – la naștere, la 14 zile de la naștere (împreună cu identificarea puilor și recuperarea țesuturilor pentru genotipare) și la înțarcare. A fost elaborată o fișă de punctare adecvată pe baza schemei de evaluare a bunăstării animalelor modificate genetic (Wells et al. 2006). Observarea puilor a fost realizată la nivelul cuștii de către tehnicienii veterinari responsabili de colonie monitorizând raportul genotipic. Șoarecii au fost adăpostiți în grup după înțarcare și, în măsura în care a fost posibil, în cuști ventilate individual cu așternut, materiale pentru cuib și alte elemente de îmbunătățire a mediului, după caz. Tehnicienii veterinari au efectuat evaluări la nivelul cuștii pe durata interacțiunilor zilnice până când șoarecii au atins maturitatea sexuală. Evaluările pe termen mai lung pentru efectele adverse asupra bunăstării asociate vârstei au fost monitorizate și înregistrate pe baza stocului de animale și a stocului viitor pentru reproducere. Toate observațiile au fost comparate cu sușa de bază și a fost evaluată relevanța acestora.

2.1.2 Evaluare prospectivă

Ce acțiuni asupra animalelor presupune studiul?	Ce vor experimenta animalele? Câtă suferință ar putea fi cauzată? Ce ar putea să o înrăutățească?	În ce mod va fi redusă la minimum suferința?	
	Efecte adverse	Metodologie și intervenții	Puncte finale de sacrificare
Efecte standard ale modificării genetice	<p>Modificarea genetică poate cauza efecte clinice adverse</p> <p>În cazurile în care acestea nu pot fi prevăzute, orice indiciu referitor la faptul că animalele cu mutație genetică s-au îndepărtat de la parametrii fizici sau comportamentali normali (și anume, cei cunoscuți ca apărând pe fondul genetic asociat fenotipurilor și/sau al martorilor de tip sălbatic) ar putea indica o problemă de bunăstare</p>	<p>Monitorizare permanentă în cușcă</p> <p>Evaluarea bunăstării în stadii de dezvoltare definite: naștere, înțarcare și maturitate sexuală</p> <p>În funcție de natura efectelor adverse depistate, se vor aplica, în măsura în care este posibil, factori de ameliorare adecvați precum strategii de reproducere modificate sau îmbunătățiri în materie de creștere (de exemplu, materiale pentru cuib</p>	<p>Animalele vor fi sacrificate dacă se depășește nivelul moderat de severitate</p>

		suplimentare pentru a îmbunătăți termoreglarea deficitară)	
Prelevare de țesut pentru genotipare	<p>Posibilă durere și/sau suferință cauzată de metodologia de prelevare de țesut, de exemplu, perforarea/crestarea urechii sau „tăierea vârfului cozii”</p> <p>Biopsia cozii este folosită, de regulă, atunci când sunt necesare cantități mai mari de ADN, dar poate provoca durere atât pe termen scurt, cât și pe termen lung (cea de durată ca urmare a formării de neuroame)</p>	<p>În cazul în care identificarea animalelor individuale se realizează folosind perforarea urechii, o bună practică este aceea de a folosi țesut de la nivelul urechii pentru genotipare, dacă este posibil</p> <p>Pentru „tăierea vârfului cozii”, ar trebui prelevată o bucată minimă (reținând faptul că prelevarea repetată este categoric nerecomandată), anestezia și analgezia ar trebui folosite după caz, iar sângerarea excesivă ar trebui tratată prompt</p> <p>Ar trebui ca evoluțiile în materie de tehnici mai puțin invazive să fie monitorizate, evaluate la nivel local și aplicate ori de câte ori este fezabil</p>	<p>Nu se aplică, întrucât procedura ar trebui să fie unică și este puțin probabil ca durerea sau suferința provocată să atingă un nivel care să necesite sacrificarea printr-o metodă umană</p>
Fenotipare	<p>Stres indus de manipulare sau aplicarea testului fenotipic, de exemplu, stresul de a fi mutat într-un mediu nefamiliar, administrarea de compuși experimentali pentru a induce un răspuns, monitorizarea infecției, anestezie și reținerea pentru imagistică etc.</p>	<p>Înstruirea personalului care efectuează fenotiparea în materie de proceduri de manipulare și observare competente, empatică și standardizate</p> <p>Utilizarea anesteziei pe durata procedurilor imagistice sau a celor dureroase. Structurarea testelor</p>	<p>În cazul în care mutația generează un răspuns sever în cadrul unui test fenotipic, se ating punctele finale de sacrificare, iar animalele vor fi sacrificate printr-o metodă umană</p>

		fenotipice de la cel mai puțin invazive (de exemplu, observarea comportamentului într-un cadru deschis) la cele mai invazive (de exemplu, proceduri necesitând anestezie)	
--	--	---	--

Gena care face obiectul investigației este un mutant nou cu efecte adverse, deși necunoscute. Experiența în această unitate a arătat că majoritatea modelelor similare au prezentat, în general, un fenotip superficial. Cu toate acestea, ocazional, un model va prezenta în mod neașteptat semne clinice moderate și, prin urmare, pe această bază, exemplul va fi clasificat prospectiv ca fiind de gravitate MODERATĂ.

2.1.3 Rezultate

Evaluare inițială la animale neonatale (la naștere):

Culoarea puilor (doar pentru nou-născuți)	Normală
Activitatea puilor (doar pentru nou-născuți)	Normală
Identificarea laptelui (doar pentru nou-născuți)	Prezentă
Pui	Toți puii s-au încadrat în parametrii generali referitori la dimensiunile la naștere, omogenitatea la naștere, dezvoltarea și creșterea puilor

Următorii indicatori au fost observați la 14 zile de la naștere și la înțarcare:

Aspect general	Toți puii erau „normali” din punct de vedere morfologic Nu au fost observate semne de malformații
Dimensiune, conformație și creștere	Creștere normală, în conformitate cu curba de creștere standard pentru sușa de bază
Starea blăni	Normală
Comportament – postură, mers, activitate și interacțiuni cu mediul	Comportamente și interacțiuni normale între toți colegii de cușcă; nu a fost observată hiperactivitate sau agresiune
Semne clinice	Niciunul
Dimensiunea relativă	Normală comparativ cu sușa de bază
Număr	Rata de mortalitate anterior înțărării era normală în conformitate cu sușa de bază

Observații clinice

Toate observațiile și raporturile referitoare la puii nou-născuți până la înțărarea acestora au fost considerate normale în raport cu fondul genetic (C57BL/6N) cu șoareci homozigoți, heterozigoți și de tip sălbatic născuți cu raporturi mendeliene normale.

La vârsta de 4 săptămâni, șoarecii homozigoți și cei martor de tip sălbatic (7+7) au fost supuși unei serii de teste observaționale și procedurale blânde precum SHIRPA, dismorfologie, câmp deschis, chimie clinică a sângelui, DEXA și imagistică Faxitron pe o perioadă de 16 săptămâni. La încheierea experimentului, analiza fenotipică a evidențiat o reducere a eliminării glucozei la șoarecii homozigoți în urma unui test intra-peritoneal de toleranță la glucoză (ipGTT). Deși eliminarea glucozei a fost redusă pe durata experimentului, în urma procedurii toate animalele au revenit la starea de bază și nu au fost notate alte efecte adverse.

2.1.4 Analiza rezultatelor

Evaluarea gradului real de severitate

După stabilirea coloniei, menținerea și evoluția coloniei s-a făcut pe bază de pui heterozigoți și de pui de tip sălbatic. Nu au fost observate fenotipuri dăunătoare la niciunul dintre șoarecii folosiți pentru reproducere și menținere, considerându-se astfel că acestea nu prezintă efecte adverse. Deoarece nu este preconizat niciun fenotip dăunător linia a putut fi transformată în una homozigotă și menținută fără autorizație de proiect.

Împerecherea menționată mai sus între șoareci heterozigoți a produs șoareci homozigoți. Un grup de astfel de șoareci a fost utilizat pentru un control fenotipic standard constând într-o serie de protocoale blânde, inclusiv inserarea unui ac pentru prelevare de sânge pe durata testului intra-peritoneal de toleranță la glucoză. Martorii de tip sălbatic au fost supuși la testele respective în același timp. Efectul cumulativ asupra șoarecilor ar fi fost unul superficial, din cauza prelevării de sânge și a procedurilor ulterioare de fenotipare, spre deosebire de efectul general al modificării genetice.

Rezumat

Reproducere și menținere – fără efecte adverse

Șoareci homozigoți + șoareci martor – SUPERFICIAL – datorită testelor de screening (nu constituie un efect al modificării genetice)

În rezumat, linia de șoareci modificați genetic poate fi considerată ca având un fenotip nedăunător. Reproducerea liniilor stabilite nu ar necesita autorizarea proiectului în temeiul directivei.

2.2 Model de șoarece modificat genetic – $Tg(GeneB)^{Labcode}$

2.2.1 Context general

Va fi creată o colonie de șoareci cu o mutație care prezintă o transgenă în exces ca model pentru studierea unei forme de cancer. Linia va fi creată pe fond C57BL/6N. Cu toate acestea, declanșarea și rata de dezvoltare a tumorii nu pot fi definite și vor necesita evaluare ca parte a caracterizării modelului. Odată cu stabilirea liniilor fondatoare se va realiza un screening de bază a evaluării bunăstării astfel cum se descrie în secțiunea 2.1. Linia cea mai utilă va fi dezvoltată pentru studierea respectivului tip de leucemie.

2.2.2 Evaluare prospectivă

Ce acțiuni asupra animalelor presupune studiul?	Ce vor experimenta animalele? Câtă suferință ar putea fi cauzată? Ce ar putea să o înrăutățească?	În ce mod va fi redusă la minimum suferința?	
	Efecte adverse	Metodologie și intervenții	Puncte finale de sacrificare
<p>Evaluarea și caracterizarea dezvoltării tumorii</p>	<p>Pierderea în greutate și înrăutățirea stării generale se vor accentua odată cu evoluția cancerului</p> <p>Inflamările subcutanate pot cauza disconfort, pot afecta comportamentul normal, postura sau locoțiunea</p> <p>Animalele pot fi mai sensibile la boli ca urmare a sistemului imunitar compromis</p>	<p>Intervențiile se vor baza pe observațiile zilnice folosind criterii precum pierderea în greutate, pierderea condiției corporale, letargie etc.</p> <p>Observații zilnice și monitorizarea stării generale de sănătate și a extinderii tumorii</p>	<p>Stocul și animalele pentru reproducere care prezintă semne clinice care nu sunt caracteristice procedurilor experimentale precum o scădere în greutate de peste 15 %, condiție deficitară a blăunii, letargie vor fi sacrificate printr-o metodă umană</p> <p>Animalele vor fi sacrificate printr-o metodă umană dacă tumora ulcerează sau dacă afectează comportamentul normal, postura sau locoțiunea sau dacă depășește un diametru de 1,2 cm</p> <p>Animalele care prezintă semne de boli intercurente vor fi sacrificate printr-o metodă umană</p>

Modelul investigat va fi supus unei mutații pentru a crea deficiența genetică preconizată. Declanșarea bolii nu poate fi prevăzută cu ușurință, dar semnele clinice pot fi predefinite pentru a permite caracterizarea declanșării. Odată caracterizat, modelul ar trebui menținut pentru a permite

utilizarea acestuia în studii experimentale ulterioare referitoare la tratamente pentru tipul de cancer studiat. Pe această bază, exemplul ar fi clasificat prospectiv ca având un grad severitate MODERAT.

2.2.3 Rezultate

Evaluările bunăstării au fost efectuate în conformitate cu secțiunea 2.2 de mai sus. Nu au fost observate anomalii în stadiile de dezvoltare, în perioada de creștere până la maturitatea sexuală. Colonia a fost extinsă cu stoc, iar viitoarele animale pentru reproducere s-au împerecheat din cea de a 10-a săptămână de viață pentru a menține colonia și pentru a produce noi animale experimentale. Animalele au fost monitorizate pe întreaga perioadă, iar dezvoltarea tumorii a fost observată din cea de a 18-a săptămână de viață la 60 % din animalele mutante. Evoluția clinică a bolii a avut loc timp de 4-6 săptămâni, după care animalele au fost sacrificate.

2.2.4 Analiza rezultatelor

Evaluarea gradul real de severitate

S-a observat dezvoltarea tumorii la 60 % din animalele mutante de la vârsta de 18 săptămâni. Strategia de reproducere a presupus împerecherea animalelor de la vârsta de 10 săptămâni. Potențialul ca perechile pentru reproducere să dezvolte tumori a fost considerat suficient pentru a modifica reproducerea și menținerea. Perechile pentru reproducere au fost apoi împerecheate de la vârsta de 6 săptămâni, iar perechile au fost despărțite după 12 săptămâni de viață, masculii fiind sacrificați. Stocul și femelele pentru reproducere au fost monitorizate zilnic pentru a se depista semnele timpurii de dezvoltare a tumorii. Animalele care nu au fost folosite sau care nu au fost necesare au fost sacrificate printr-o metodă umană înainte de declanșarea semnelor clinice.

Rezumat

Animale sub vârsta de 18 săptămâni – fără reacții adverse

Animale cu vârstă de peste 18 săptămâni, dezvoltând tumori – SUPERFICIALĂ, datorită punctelor finale clinice timpurii

Animale cu vârstă de peste 18 săptămâni, dezvoltând tumori și alese pentru a fi folosite – SUPERFICIALĂ sau MODERATĂ în funcție de aplicarea punctelor finale clinice.

2.3 Modelul de șoarece modificat genetic – *GeneC*^{tm1a(Funding)Lab}

2.3.1 Context general

A fost creată o colonie de șoareci cu o mutație a *GeneC* vizând o linie de celule stem embrionare derivată pe fondul C57BL/6N cu un potențial fenotipic cunoscut pentru a testa comportamentul și memoria. Modelul a fost menținut pe un fond definit (C57BL/6N). Ulterior realizării transmierii liniei de germeni a șoarecilor G1, s-a efectuat un screening de bază pentru evaluarea bunăstării.

2.3.2 Evaluare prospectivă

Precum în secțiunea 2.1, gena investigată este un mutant nou. Intenția este aceea de a folosi modelul în viitoare studii comportamentale care testează eficacitatea noilor compuși farmaceutici. Experiența în această unitate a arătat că marea majoritate a modelelor similare prezintă, în general, un fenotip superficial. Cu toate acestea, ocazional, un model va prezenta în mod neașteptat semne clinice moderate, prin urmare, pe această bază, exemplul va fi clasificat prospectiv ca având gravitate MODERATĂ.

2.3.3 Rezultate

Toate observațiile și raporturile referitoare la puii nou-născuți până la înțarcarea acestora au fost considerate normale în raport cu fondul genetic (C57BL/6N) cu șoareci homozigoți, heterozigoți și de tip sălbatic născuți prin raporturi mendeliene normale.

La vârsta de 4 săptămâni, șoarecii homozigoți și cei martor de tip sălbatic au fost supuși unor serii de observații și testați în vederea evaluării învățării și memoriei. Testele au fost derulate pe o perioadă de 10 săptămâni. La încheierea analizei fenotipice nu au fost observate fenotipuri dăunătoare. Modelul a fost apoi folosit pentru a testa eficacitatea noilor compuși farmaceutici.

Reproducerea șoarecilor heterozigoți a produs animale homozigote sănătoase cu o performanță reproductivă similară cu cea a sușei de bază. Ca atare, pentru a reduce numărul de animale, a fost folosită o strategie de reproducere bazată pe împerecheri între homozigoți. În contrast cu împerecherea inițială, prin care au fost derivați șoareci homozigoți din împerecheri între șoareci heterozigoți, noul grup de animale homozigote derivate din împerecheri de animale homozigote a fost unul slăbit și nu a reușit să-și recapete complet dimensiunea și greutatea în comparație cu frații lor.

Deși linia a fost inițial concepută ca un model pentru testarea comportamentului și a memoriei, au fost efectuate analize suplimentare pe baza țesuturilor și a sângelui obținut de la animale. Pe durata analizei rezultatelor obținute în urma biochimiei sângelui și a revizuirii ulterioare a literaturii de specialitate, s-a constatat că *GeneC* este o proteină de transport esențială care se leagă de vitamina B12. Eliminarea acesteia a rezultat într-o rupere a mecanismului de transport extracelular conducând la deficiențe ale sintezei ADN-ului și ale metabolismului lipidelor și proteinelor. Efectul mutației nu ar fi fost observat la șoareci născuți dintr-o femelă heterozigotă deoarece sursa maternă de vitamina B12 este transferată *in-utero* prin intermediul placentei la fătul în curs de dezvoltare. Knockout-urile inițiale ale genelor respective aveau, prin urmare, un depozit suficient de B12 pentru a le permite să supraviețuiască și să se dezvolte cel puțin până la vârsta de 16 săptămâni, asigurând o reproducere și o fertilitate normală comparativ cu sușa de bază.

2.3.4 Analiza rezultatelor

Evaluarea gradului real de severitate

Exemplul demonstrează că menținerea unei colonii poate avea un efect profund și deseori neașteptat asupra șoarecilor. Pe baza informațiilor anterioare disponibile și a rezultatelor reproducerii primare și fenotipării, colonia ar fi părut una obișnuită. În mod logic, menținerea unei colonii printr-o strategie de împerechere între animale homozigote ar garanta în mod normal că se produce un număr minim de animale, fapt de dorit în vederea reducerii la minimum a utilizării animalelor. Fenotipurile dăunătoare neprevăzute pot apărea în linii menținute ca animale normale fără autorizație de proiect. Ca o consecință a efectelor adverse asupra bunăstării animalelor în exemplul de față, modelul ar necesita reautorizarea proiectului în cazul în care s-ar aplica acest tip de schemă de reproducere.

Rezumat

Reproducerea și menținerea perechilor heterozigote – fără efecte adverse

Reproducerea și menținerea perechilor homozigote – grad de severitate MODERAT pentru urmașii generației, cauzat de slăbire și de incapacitatea de dezvoltare

Exemplul 2.3 – Aceasta subliniază necesitatea transferului de date exacte și utile privind bunăstarea între institute atunci când este posibilă apariția de fenotipuri dăunătoare, de exemplu, sub forma unui „pașaport al șoarecelui”ⁱ.

ⁱ RSPCA GA Passport Working Group (2010) *GA Passports: The Key to Consistent Animal Care*. Southwater, UK: RSPCA (disponibil la adresa <http://www.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals/implementing3rs/gapassport>)

