



UNIVERSITÀ DI PARMA

Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie

Corso di laurea Magistrale in Produzioni Animali Innovative e Sostenibili

ALLEVAMENTI SPERIMENTALI DI RODITORI NELLA RICERCA IN VIVO: GESTIONE, SOSTENIBILITÀ E APPLICAZIONE DEL PRINCIPIO DELLE 3R SECONDO IL D.LGS. 26/2014

EXPERIMENTAL RODENT BREEDING FACILITIES IN IN VIVO
RESEARCH: MANAGEMENT, SUSTAINABILITY AND APPLICATION
OF THE 3RS PRINCIPLE IN ACCORDANCE WITH LEGISLATIVE
DECREE 26/2014

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Maria Cristina Ossiprandi

Correlatore:

Chiar.mo Prof. Maurizio Dondi

Laureanda:

Riccarda Bernorio

Matricola n. 367133

ANNO ACCADEMICO

2025/2026

Sommario

Abstract	5
Introduzione.....	6
CAPITOLO 1 - La ricerca in vivo e il ruolo dei roditori da laboratorio	9
1.1 Definizione di ricerca in vivo	9
1.2 I roditori come modelli animali	11
1.3 Vantaggi scientifici dei roditori	12
1.4 Limiti del modello roditore.....	14
1.5 Importanza per le produzioni animali innovative e sostenibili	15
CAPITOLO 2 - Quadro normativo europeo ed italiano.....	17
2.1 La Direttiva 2010/63/UE.....	17
2.2 Il D.Lgs. 26/2014	21
2.3 Organi responsabili e figure professionali.....	24
CAPITOLO 3 - Il principio delle 3R nella ricerca con roditori.....	26
3.1 Introduzione ed Evoluzione Storica dei Principi delle 3R.....	26
3.2 Ridefinizione delle 3R nel Contesto Scientifico Moderno	27
3.3 Metodologie ad Approccio Alternativo (NAMs)	28
3.4 Il Quadro Regolatorio Internazionale e l'Accettazione Istituzionale	29
CAPITOLO 4 - Struttura e organizzazione di un allevamento sperimentale di roditori.....	31
4.1 Definizione di stabulario e allevamento sperimentale	31
4.2 Requisiti strutturali	32
4.3 Sistemi di stabulazione	33
4.4 Parametri ambientali	34
4.5 Biosicurezza	35
4.6 Classificazione sanitaria degli animali.....	36
CAPITOLO 5 - Gestione biologica e zootecnica dei roditori sperimentali.....	38
5.1 Biologia e comportamento del topo	38
5.2 Biologia e comportamento del ratto.....	39
5.3 Cavia e criceto.....	40
5.4 Alimentazione.....	41
5.5 Lettieria e materiale da nido	42
5.6 Riproduzione e gestione delle colonie	43
5.7 Identificazione degli animali	44
5.8 Trasporto e movimentazione	45
CAPITOLO 6 - Benessere animale negli allevamenti sperimentali di roditori	47

6.1 Concetto di benessere negli animali da laboratorio	47
6.2 Indicatori di stress e sofferenza	48
6.3 Arricchimento ambientale	52
6.4 Handling e interazione uomo-animale.....	54
6.5 Humane endpoints	56
6.6 Anestesia, analgesia e procedure	58
6.7 Soppressione eutanasica.....	59
CAPITOLO 7 - Sostenibilità degli allevamenti sperimentali di roditori	62
7.1 Concetto di sostenibilità applicato agli stabulari.....	62
7.2 Consumo energetico	63
7.3 Consumo idrico	65
7.4 Rifiuti prodotti dagli stabulari	66
7.5 Impatto dei materiali monouso	67
7.6 Sostenibilità nella gestione delle colonie.....	68
7.7 Sostenibilità e qualità scientifica	70
7.8 Strategie pratiche di miglioramento	71
CAPITOLO 8 - Applicazione pratica delle 3R nella gestione degli allevamenti.....	73
8.1 Replacement nella fase di progettazione	73
8.2 Reduction nella pianificazione sperimentale	73
8.3 Reduction nella gestione riproduttiva	74
8.4 Refinement nelle pratiche quotidiane	74
8.5 Refinement nelle procedure sperimentali	75
8.6 Indicatori per valutare l'efficacia delle 3R.....	75
CAPITOLO 9 - Ruolo del medico veterinario e del personale tecnico.....	77
9.1 Il medico veterinario designato	77
9.2 Il personale addetto alla cura degli animali	77
9.3 Formazione e competenza	78
9.4 Comunicazione interna	78
CAPITOLO 10 - Criticità attuali e prospettive future	79
10.1 Criticità scientifiche.....	79
10.2 Criticità etiche.....	81
10.3 Criticità gestionali	82
10.4 Innovazioni tecnologiche.....	82
10.5 Verso stabulari più sostenibili.....	84
10.6 Prospettive di progressiva sostituzione.....	85
Conclusioni.....	88

<i>Bibliografia</i>	90
----------------------------------	-----------

Abstract

Laboratory rodents, particularly mice and rats, represent approximately 90% of animals used in biomedical research. This thesis examines the comprehensive management of experimental rodent facilities, focusing on the integration of welfare standards, regulatory compliance, and sustainability within the framework of Italian Legislative Decree 26/2014, which transposes EU Directive 2010/63/EU. The study explores the scientific rationale for rodent models, critically addressing both their biological advantages and translational limitations. The regulatory framework is examined in depth, emphasizing project authorization, the role of the Animal Welfare Body (OpBA), and facility requirements. The core of the thesis focuses on the practical application of the 3Rs principle—Replacement, Reduction, and Refinement—across all operational phases: from colony management and environmental enrichment to non-aversive handling, pain management, and humane endpoints. Sustainability emerges as a fourth pillar, encompassing environmental, economic, and scientific dimensions, with concrete strategies including cryopreservation and waste reduction. While complete replacement of animal models remains currently unattainable, emerging New Approach Methodologies (NAMs) offer promising alternatives for specific applications. The thesis concludes that contemporary in vivo research, conducted under stringent welfare standards, represents a necessary but transitional phase. The integration of the 3Rs with sustainability principles delineates a responsible path forward, moving toward a future where animal experimentation becomes progressively more refined, reduced, and ultimately justified as an exception rather than a routine practice.

Introduzione

La sperimentazione animale rappresenta da oltre un secolo una componente fondamentale della ricerca biomedica moderna, fornendo modelli che permettono di porre domande ed esplorare soluzioni utili per la salute umana e animale (Garattini, 1998). I modelli animali hanno reso possibili progressi determinanti in ambito diagnostico e terapeutico, contribuendo allo sviluppo di vaccini, antibiotici, chemioterapici e tecniche chirurgiche che hanno radicalmente migliorato le aspettative e la qualità di vita (Garattini, 1998).

La ricerca in vivo offre un apporto fondamentale alla medicina umana e, in misura minore, fornisce un utile supporto anche alla medicina veterinaria. La comprensione delle patologie animali, lo sviluppo di farmaci veterinari e l'ottimizzazione dei protocolli terapeutici per diverse specie dipendono in larga misura dalla sperimentazione condotta su modelli animali (Garattini, 1998).

La ricerca scientifica si avvale di diversi approcci metodologici, ciascuno con specifiche potenzialità e limitazioni. La ricerca in vitro prevede lo studio di cellule, tessuti o organi isolati dal loro contesto biologico originale, consentendo indagini controllate su meccanismi molecolari e cellulari in condizioni sperimentali standardizzate (Garattini, 1998). Gli studi ex vivo si distinguono per l'analisi di tessuti prelevati da un organismo vivente ma mantenuti in condizioni che ne preservano parzialmente la funzionalità. La ricerca in silico utilizza modelli computazionali e simulazioni matematiche per predire effetti biologici, rappresentando uno strumento sempre più potente grazie all'avanzamento delle capacità di calcolo. La ricerca in vivo, invece, viene condotta su organismi viventi integri, e si differenzia sostanzialmente da questi approcci per la capacità di cogliere le complesse interazioni tra sistemi fisiologici, gli effetti sistemici di farmaci e sostanze, e le risposte organiche che emergono solo nell'organismo nella sua interezza (Garattini, 1998).

Topi e ratti costituiscono circa il 90% degli animali utilizzati in laboratorio (Garattini, 1998), una percentuale che riflette le ragioni scientifiche, economiche e pratiche alla base della loro predominanza. I roditori presentano caratteristiche biologiche che li rendono particolarmente adatti alla sperimentazione: il loro ciclo riproduttivo breve, l'elevato numero di figli per nidiata, la facilità di mantenimento in condizioni standardizzate e la possibilità di controllare rigorosamente

il patrimonio genetico attraverso l'allevamento in ceppi inbred. Questi fattori, che verranno approfonditi in seguito, consentono di ridurre la variabilità sperimentale e aumentare la riproducibilità dei risultati (Garattini, 1998).

A queste considerazioni si aggiungono ragioni di natura economica e logistica. Rispetto all'utilizzo di specie più grandi, i roditori rappresentano la soluzione più sostenibile in termini di costi e spazi (Garattini, 1998). Inoltre, lo sviluppo di modelli geneticamente modificati ha ulteriormente consolidato il ruolo centrale del roditore nella ricerca biomedica, consentendo di studiare il ruolo di specifici geni nella fisiopatologia umana (Garattini, 1998).

Per quanto riguarda l'opinione pubblica, la sperimentazione animale è da decenni al centro di un dibattito complesso che coinvolge dimensioni etiche, scientifiche e sociali. Sul piano etico, il conflitto si articola attorno alla legittimità di utilizzare esseri senzienti per finalità umane, contrapponendo il principio del rispetto della vita animale alla necessità di proteggere la salute umana (Garattini, 1998). Sul piano scientifico, invece, il dibattito si concentra sulla validità e trasferibilità dei modelli animali alla specie umana, nonché sulla riproducibilità dei risultati sperimentali. Va tuttavia rilevato che la ricerca scientifica spesso non dà risultati prevedibili, e che molti dei maggiori successi della medicina moderna sarebbero stati impensabili senza la sperimentazione animale (Garattini, 1998). La dimensione sociale del dibattito è alimentata da rappresentazioni spesso distorte della realtà della ricerca, che tendono a focalizzarsi sugli animali con cui il pubblico ha maggiore familiarità affettiva (cani, gatti), mentre la stragrande maggioranza degli animali utilizzati è costituita da roditori (Garattini, 1998). Questa linea di pensiero si estende anche a un'altra categoria di animali il cui utilizzo è fortemente criticato, ovvero quella dei primati; per via della loro spiccata somiglianza alla specie umana, nella comunicazione, nelle dinamiche sociali e nella manifestazione delle emozioni, suscitano nel pubblico un'immediata reazione empatica. In questo contesto, la ricerca scientifica ha progressivamente sviluppato un approccio che integra il rigore metodologico con la responsabilità etica, come testimoniato dall'adozione del principio delle 3R (Russell e Burch, 1959) e dalla crescente attenzione al benessere animale come presupposto stesso della qualità scientifica.

La presente tesi si propone di analizzare la gestione degli allevamenti sperimentali di roditori, ponendo particolare attenzione ai molteplici aspetti che concorrono a definire un modello di

gestione sostenibile, eticamente responsabile e scientificamente valido. Nello specifico, gli obiettivi che guidano questo lavoro sono i seguenti.

In primo luogo, analizzare la gestione degli allevamenti sperimentali di roditori, esaminando le condizioni di stabulazione, le pratiche di allevamento, i controlli sanitari e le procedure operative che caratterizzano gli stabulari italiani, con particolare riferimento alle direttive del D.Lgs. 26/2014 (Decreto Legislativo 4 marzo 2014, n. 26).

In seguito, valutare il ruolo della sostenibilità ambientale, economica e gestionale, considerando come la qualità della stabulazione, le scelte progettuali e l'organizzazione degli spazi incidano non solo sul benessere animale ma anche sull'affidabilità dei risultati scientifici e sui costi di gestione.

Dopodiché, approfondire l'applicazione del principio delle 3R (Replacement, Reduction, Refinement) come paradigma etico e metodologico che orienta la progettazione sperimentale e la gestione degli animali da laboratorio (Russell e Burch, 1959), esaminando come questi tre criteri si traducano in pratiche concrete all'interno degli stabulari.

Infine, collegare la gestione dello stabulario agli obblighi del D.Lgs. 26/2014, analizzando come la normativa italiana, in attuazione della Direttiva Europea 2010/63/UE (Parlamento Europeo e Consiglio, 2010), definisca i requisiti strutturali, organizzativi e procedurali che gli stabilimenti utilizzatori o allevamenti devono rispettare, e come questi requisiti influenzino le pratiche quotidiane di gestione.

CAPITOLO 1- La ricerca in vivo e il ruolo dei roditori da laboratorio

1.1 Definizione di ricerca in vivo

Il termine "ricerca in vivo" (dal latino "dentro il vivente") identifica ogni studio sperimentale condotto su un organismo vivente, animale o umano, nel suo complesso (Verywell Health, 2008). Questo approccio si contrappone alla ricerca in vitro (dal latino "nel vetro"), che viene eseguita al di fuori dell'organismo, ad esempio in provette o piastre di laboratorio. La sperimentazione in vivo è considerata un passaggio fondamentale per comprendere come un organismo risponda a stimoli, farmaci o modifiche genetiche, fornendo informazioni che i modelli cellulari o tissutali da soli non possono offrire (National Research Council, 2011).

La definizione di "procedura sperimentale" viene riportata nella normativa italiana (D.Lgs. 26/2014). Essa comprende una o più attività eseguite su un animale utilizzato a fini scientifici o didattici che possano causare un livello di dolore, sofferenza, angoscia o danno equivalente o superiore a quello provocato dall'introduzione di un ago, in base alle buone pratiche veterinarie (D.Lgs. 26/2014, Art. 3). È fondamentale distinguere le diverse attività che interessano gli animali in un centro di ricerca. Infatti, non tutte le attività che coinvolgono un animale sono considerate "procedure". L'allevamento di routine, le osservazioni del comportamento, il contenimento e la cura degli animali in condizioni standard (es. fornitura di cibo, acqua, pulizia delle gabbie) non rientrano nella definizione di procedura sperimentale, a condizione che non causino sofferenza agli animali (D.Lgs. 26/2014, Art. 3; National Research Council, 2011).

Per quanto riguarda la creazione e il mantenimento di una colonia di animali geneticamente modificati, questo comporta un'attività complessa. Il processo include l'accoppiamento di animali, la genotipizzazione (l'analisi del DNA per verificare la presenza della modifica genetica) e la gestione della colonia per garantire la sopravvivenza e la riproducibilità della linea (The Francis Crick Institute, 2024). Tali attività sono essenziali per la ricerca, ma devono essere gestite in modo etico e possono essere ottimizzate per ridurre il numero di animali utilizzati, in applicazione del principio delle 3R (Russell e Burch, 1959). Inoltre, secondo il D.Lgs. 26/2014, la definizione di "procedura" include esplicitamente anche la creazione e il mantenimento di una linea di animali geneticamente modificati con fenotipo sofferente. L'allevamento di questi animali, specialmente

quando il fenotipo dannoso è incerto o imprevedibile, rappresenta una sfida etica e normativa che richiede una valutazione prospettica del danno e una classificazione della severità. Quindi, il mantenimento di colonie di roditori geneticamente modificati con un fenotipo probabile sofferente è soggetto a preventiva autorizzazione del progetto e a una rigorosa valutazione del rapporto danno-beneficio.

Quindi, la sperimentazione in vivo è costituita dalla stesura di un progetto di ricerca con uno specifico obiettivo, contenente una o più procedure. Le procedure, a seconda della natura del progetto, comprendono l'applicazione di un trattamento, la somministrazione di un farmaco, l'induzione di una malattia, l'esecuzione di una procedura chirurgica o comportamentale per rispondere a una specifica domanda scientifica (National Research Council, 2011). Il progetto di ricerca è soggetto a una rigida valutazione ed eventuale autorizzazione da parte delle autorità competenti che verranno definite successivamente. Le autorità competenti valutano il progetto da un punto di vista scientifico ed etico (D.Lgs. 26/2014, Art. 38).

Le finalità della ricerca in vivo sono estremamente ampie e riguardano numerosi ambiti scientifici (National Research Council, 2011; Domínguez-Oliva et al., 2025):

- Biomedica: lo studio delle basi fisiologiche e patologiche delle malattie umane (es. malattie neurodegenerative come l'Alzheimer, tumori, patologie infiammatorie).
- Tossicologica: la valutazione della sicurezza di sostanze chimiche, farmaci e prodotti, per identificare potenziali effetti dannosi sull'organismo.
- Farmacologica: lo sviluppo e il test di nuovi farmaci per valutarne l'efficacia e la sicurezza prima degli studi clinici sull'uomo.
- Nutrizionale: lo studio dell'impatto di diete, additivi, probiotici e nutrienti sul metabolismo, sulla crescita e sulla salute dell'organismo.
- Comportamentale: l'analisi dei meccanismi del comportamento, dell'apprendimento, della memoria e delle emozioni in condizioni normali e patologiche (come l'ansia o la depressione).
- Immunologica: la comprensione del funzionamento del sistema immunitario e lo sviluppo di vaccini e immunoterapie.
- Oncologica: lo studio della crescita tumorale, dei meccanismi di metastasi e lo sviluppo di nuove terapie antitumorali.

L'impiego di animali in queste ricerche è consentito solo come ultima risorsa, quando non esistono metodi alternativi validi per raggiungere lo stesso obiettivo (D.Lgs. 26/2014, Art. 13; Direttiva 2010/63/EU).

1.2 I roditori come modelli animali

I roditori rappresentano la stragrande maggioranza degli animali utilizzati nella ricerca scientifica (Immagine 1). La loro diffusione è dovuta a una combinazione di vantaggi scientifici, pratici ed economici (National Research Council, 2011).

Le diverse specie o gruppi di animali impiegati a scopo scientifico nel nostro Paese

Topi Ratti Pollame domestico
Porcellini d'India Altro

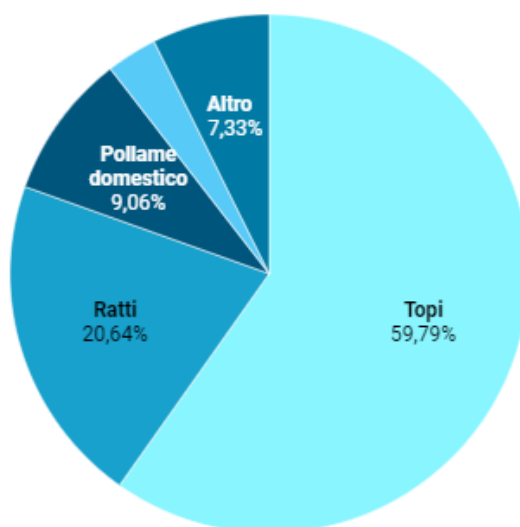


Immagine 1: specie impiegate a scopo scientifico in Italia nel 2020. Immagine presa e modificata da AboutPharma, 2023.

Topo (*Mus musculus*): È il modello animale per eccellenza nella ricerca biomedica. La sua importanza è tale che il suo genoma è stato completamente sequenziato e sono disponibili migliaia di ceppi geneticamente modificati (*knock-out*, *knock-in*, transgenici) per studiare la funzione di specifici geni, rendendolo insostituibile in ambito oncologico, immunologico e delle neuroscienze (National Research Council, 2011). La possibilità di creare modelli con un sistema nervoso relativamente semplice lo rende uno strumento potente per studiare processi complessi.

Ratto (*Rattus norvegicus*): Storicamente, è stata la specie di elezione in fisiologia, farmacologia e tossicologia (National Research Council, 2011). Le sue dimensioni maggiori rispetto al topo lo rendono più adatto per studi chirurgici, prelievi di sangue ripetuti e per l'impianto di cannule e sensori. La sua maggiore capacità cognitiva lo rende inoltre un modello prezioso per studi di apprendimento, memoria e comportamento sociale più complessi (Domínguez-Oliva et al., 2025).

Cavia (*Cavia porcellus*): Sebbene meno utilizzata del topo e del ratto, la cavia mantiene un ruolo importante in alcuni settori. È storicamente nota per gli studi sulla tubercolosi e per lo sviluppo di vaccini. Rappresenta un modello ancora molto rilevante in specifici campi di ricerca grazie alla sua particolare fisiologia: non è in grado di sintetizzare vitamina C (Nature, 1973) e presenta una risposta immunitaria che la rende un modello di elezione per lo studio di alcune infezioni batteriche e virali (National Research Council, 2011).

Criceto (*Mesocricetus auratus*): Il criceto siriano è un modello importante per la ricerca riproduttiva, grazie al suo ciclo estrale regolare e ben caratterizzato (Elidio et al., 2021). È inoltre ampiamente utilizzato per lo studio di infezioni virali e per la ricerca oncologica, in particolare per i tumori indotti da virus. La sua peculiarità, ovvero quella di essere un animale solitario e territoriale, lo rende un modello interessante anche per studi di aggressività e stress sociale (Elidio et al., 2021).

Oltre a queste specie, in alcuni contesti di ricerca vengono utilizzati altri roditori meno comuni, come il gerbillo (*Meriones unguiculatus*) per studi di ischemia cerebrale (grazie alla sua anatomia vascolare cerebrale unica) o alcune specie di ratti selvatici per studi di ecologia comportamentale (National Research Council, 2011).

1.3 Vantaggi scientifici dei roditori

Il successo e l'ampio utilizzo dei roditori nella ricerca in vivo sono dovuti a una serie di innegabili vantaggi scientifici e pratici (National Research Council, 2011; Domínguez-Oliva et al., 2025).

La loro capacità di riprodursi rapidamente e di generare una prole numerosa in tempi brevi, infatti il topo ha una gestazione di circa 19-21 giorni e una nidiata di 6-12 piccoli, sono caratteristiche che hanno reso questo modello uno dei più utilizzati nella ricerca in vivo. Queste peculiarità permettono di ottenere dati su più generazioni in tempi relativamente contenuti, agevolando gli studi genetici e lo sviluppo di nuove linee transgeniche (The Francis Crick Institute, 2024). Inoltre, la loro piccola taglia comporta minori costi di mantenimento, minore spazio richiesto negli stabulari, meno cibo e una logistica più semplice, anche in termini di smaltimento dei rifiuti e un minor consumo di sostanze in fase di sperimentazione (farmaci, principi attivi), rendendo gli studi economicamente sostenibili su larga scala (National Research Council, 2011). I costi gestionali sono, in aggiunta, inferiori rispetto ad altre specie: la gestione di una colonia di roditori è decisamente meno onerosa rispetto a quella di animali più grandi come cani, primati o suini (National Research Council, 2011).

Negli anni si è anche riusciti ad ottenere una elevata standardizzazione genetica e microbiologica. La possibilità di allevare roditori in condizioni di notevole controllo sanitario (*specific pathogen-free*, SPF) e di utilizzare ceppi geneticamente definiti (isogenici) riduce la variabilità biologica tra gli animali di uno stesso esperimento. Questa uniformità è cruciale per ottenere risultati riproducibili e per ridurre il numero di animali necessari per raggiungere una significatività statistica, in applicazione del principio delle 3R (Russell e Burch, 1959; National Research Council, 2011).

La disponibilità di linee transgeniche, *knock-out*, *knock-in* e immunodeficienti rappresentano anch'esse un estremo vantaggio nell'utilizzo di queste specie. Grazie a decenni di ricerca, oggi esiste un'enorme varietà di modelli murini geneticamente modificati. Questi strumenti permettono di studiare il ruolo di un singolo gene nello sviluppo di una malattia o nella risposta a un farmaco, aprendo le porte a una medicina di precisione e a una comprensione meccanicistica della patologia (The Francis Crick Institute, 2024).

Per concludere, esiste un'ampia letteratura comparativa che include queste specie. La comunità scientifica che lavora con roditori è vastissima e ha prodotto nel corso dei decenni una mole di dati enorme riguardante la loro fisiologia, il loro comportamento e la loro risposta a migliaia di stimoli e trattamenti. Questo patrimonio di conoscenze è un punto di partenza imprescindibile

per qualsiasi nuovo studio, permettendo di contestualizzare i risultati e ridurre le incertezze e consentirne la riproducibilità (National Research Council, 2011).

1.4 Limiti del modello roditore

Nonostante gli innegabili vantaggi, l'uso dei roditori come modelli per l'uomo presenta limiti altrettanto significativi (Voelkl et al., 2020). La consapevolezza di questi limiti è fondamentale per una corretta progettazione sperimentale e per non sopravvalutare i risultati ottenuti.

Esistono sostanziali differenze fisiologiche, metaboliche e immunologiche tra un roditore e un uomo. Il metabolismo, la fisiologia del sistema nervoso, le risposte immunitarie e i processi di riparazione cellulare possono variare notevolmente, e ciò che è vero nel topo non lo è necessariamente nell'uomo (Voelkl et al., 2020). Ad esempio, alcuni agenti che causano tumori nei roditori potrebbero non avere lo stesso effetto nell'uomo e viceversa, e i dosaggi richiesti possono differire in base alla massa corporea e al metabolismo della specie. Questo porta successivamente a problemi di traslabilità dei risultati, che rappresenta forse la criticità più grande. La capacità di traslare i risultati ottenuti in un modello animale a una condizione umana è spesso limitata. Come osservato in una recente revisione (Voelkl et al., 2020), l'ambiente artificiale e lo stress del laboratorio, le differenze genetiche tra ceppi *inbred* e la variabilità umana contribuiscono a creare un "divario di traslazione" che rende i modelli animali predittori poco affidabili degli esiti clinici umani in molti campi, come quello delle neuroscienze.

La variabilità sperimentale, spesso sottovalutata, è influenzata da moltissimi fattori, quali ambiente, microbiota, sesso, età e background genetico. Lo stesso ceppo di topi può dare risultati diversi in due stabulari differenti a causa delle diverse condizioni ambientali (temperatura, umidità, cicli luce-buio) e del diverso microbiota intestinale (Voelkl et al., 2020). L'età e il sesso degli animali sono variabili cruciali, e lo stress da manipolazione è un fattore di confondimento noto che può alterare i dati (Domínguez-Oliva et al., 2025). Infatti, le normative sempre più stringenti in questo ambito hanno la finalità di limitare queste variabili oltre a garantire un sempre più elevato livello di benessere animale.

Va inoltre considerato il rischio di sovrastandardizzazione del modello sperimentale. La standardizzazione spinta è da un lato necessaria per la riproducibilità, ma dall'altro può portare a studi condotti in condizioni così artificiali da perdere di significato biologico (Voelkl et al., 2020). L'uso di animali geneticamente identici, tenuti in gabbie povere di stimoli e sottoposti a procedure invasive, può produrre modelli che non rispecchiano la complessità e la variabilità delle patologie umane. Per questo motivo si cerca di adottare metodi sperimentali che, pur mantenendo il rigore scientifico, tengano maggiormente conto del benessere animale (ad esempio, il Refinement) e, ove possibile, di introdurre maggiore variabilità per avvicinarsi al più complesso e realistico quadro clinico umano (Russell e Burch, 1959).

1.5 Importanza per le produzioni animali innovative e sostenibili

Al di là dei modelli di malattia umana, i roditori sono strumenti fondamentali anche per la ricerca in campo veterinario e zootecnico, in particolare per lo sviluppo di produzioni animali più innovative e sostenibili.

I roditori sono ampiamente utilizzati nell'ambito della nutrizione animale. Infatti, rappresentano modelli consolidati per la valutazione dell'efficacia e della sicurezza di nuovi mangimi, additivi e integratori destinati agli animali da allevamento. I modelli murini e cellulari sono largamente impiegati per studiare i meccanismi molecolari attraverso cui sostanze naturali, tra cui fitochimici, probiotici, prebiotici e oligoelementi, modulano il metabolismo energetico e migliorano l'assorbimento del glucosio, con ricadute significative per lo sviluppo di additivi alimentari non antibiotici finalizzati al miglioramento della salute e della produttività animale (Xu et al., 2024). Grazie alla possibilità di allevare roditori gnotobiotici (con un microbiota definito) o germ-free (completamente privi di batteri), è inoltre possibile studiare in maniera approfondita il microbiota intestinale. In particolare, l'impatto del microbiota sulla salute, sul metabolismo e sull'immunità dell'ospite, con ricadute importanti per la salute sia animale che umana (Domínguez-Oliva et al., 2025).

I roditori sono anche diffusamente impiegati per studiare le basi fisiologiche e patologiche di condizioni come l'obesità, le malattie metaboliche, le infiammazioni croniche e le risposte

immunitarie (Domínguez-Oliva et al., 2025). Queste ricerche sono essenziali non solo per la salute umana, ma anche per comprendere e prevenire queste patologie negli animali da reddito.

Infine, è di centrale importanza la ricerca su benessere animale e il concetto di One Health. L'approccio One Health riconosce l'interconnessione tra la salute umana, quella animale e quella ambientale (Domínguez-Oliva et al., 2025). La ricerca sui roditori in questo contesto è volta a studiare le interazioni tra gli animali e il loro ambiente, comprendendo come fattori quali lo stress, l'alimentazione e la gestione influenzano il benessere e la salute, con implicazioni dirette per la sostenibilità degli allevamenti.

CAPITOLO 2 - Quadro normativo europeo ed italiano

2.1 La Direttiva 2010/63/UE

La Direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici rappresenta il risultato di un lungo processo di revisione iniziato nel 2002, che ha portato alla sostituzione della precedente Direttiva 86/609/CEE (Olsson et al., 2016). Mentre la direttiva del 1986 era stata giustificata principalmente come strumento per armonizzare l'accesso al mercato comune (Hartung, 2010), la nuova normativa riflette l'evoluzione del contesto europeo, nel quale il benessere animale è divenuto un valore integrante dell'Unione, sancito dall'articolo 13 del Trattato sul funzionamento dell'Unione Europea (Olsson et al., 2016; Hartung, 2010).

La finalità principale della Direttiva 2010/63/UE è duplice: da un lato, garantire un elevato livello di protezione per gli animali ancora necessari per scopi scientifici, mentre dall'altro, promuovere attivamente lo sviluppo e la validazione di metodi alternativi, perseguendo l'obiettivo ultimo della riduzione al minimo dell'uso di animali vivi nelle procedure scientifiche ed educative, laddove scientificamente possibile (European Parliament and Council, 2010). La Direttiva mira, inoltre, a creare condizioni di parità tra gli Stati Membri, armonizzando le norme e impedendo che disparità normative possano costituire barriere al commercio o distorsioni della concorrenza (European Commission, 2008, citata in Olsson et al., 2016). La revisione è stata un'opportunità cruciale per la Commissione Europea per dimostrare il proprio impegno sia nel migliorare la salute umana attraverso la sperimentazione animale, sia nel migliorare il benessere animale attraverso la definizione di standard minimi (Hartung, 2010).

La Direttiva stabilisce misure per la protezione degli animali utilizzati a fini scientifici o educativi, disciplinando aspetti quali la sostituzione e la riduzione dell'uso di animali nelle procedure, il perfezionamento delle tecniche di allevamento, alloggiamento, cura e impiego, nonché la provenienza, l'identificazione e la soppressione degli animali (European Parliament and Council, 2010, Art. 1). Un principio fondamentale sancito dalla Direttiva è il riconoscimento del valore intrinseco degli animali (Recital 12), che devono essere sempre trattati come creature senzienti (European Parliament and Council, 2010). L'uso di animali nelle procedure è quindi limitato ai

settori che possono giovare alla salute umana o animale o all'ambiente, e può essere autorizzato solo quando non siano disponibili metodi alternativi (European Parliament and Council, 2010, Recital 12). La Direttiva estende inoltre il proprio ambito di applicazione alla ricerca di base e all'educazione, superando la precedente limitazione alle sole aree di attività economica (Hartung, 2010; Olsson et al., 2016).

Nella Direttiva 2010/63/UE è di fondamentale importanza il principio delle 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*), formulato da Russel e Burch nel 1959 (Hartung, 2010). Questa, infatti, rappresenta un'attuazione formale del principio stesso. L'articolo 1 della Direttiva richiama esplicitamente i tre principi, che devono essere considerati sistematicamente nell'implementazione della normativa (European Parliament and Council, 2010, Art. 1):

- *Replacement* (Sostituzione): laddove possibile, deve essere utilizzato un metodo scientificamente soddisfacente che non implichi l'uso di animali vivi (European Parliament and Council, 2010, Art. 4.1).
- *Reduction* (Riduzione): il numero di animali utilizzati nei progetti deve essere ridotto al minimo senza compromettere gli obiettivi del progetto e mantenendo la significatività statistica (European Parliament and Council, 2010, Art. 4.2).
- *Refinement* (Perfezionamento): devono essere perfezionate le tecniche di allevamento, alloggiamento e gestione, eliminando o riducendo al minimo qualsiasi possibile dolore, sofferenza, stress o danno prolungato agli animali durante tutto il ciclo di vita dell'animale (European Parliament and Council, 2010, Art. 4.3).

La Direttiva non si limita a enunciare i principi, ma introduce misure concrete per la loro attuazione, come la valutazione obbligatoria dei progetti, la classificazione della gravità delle procedure e la creazione di organismi per il benessere animale (Hartung, 2010). Inoltre, la Direttiva istituisce formalmente il Laboratorio di Riferimento dell'Unione Europea per la validazione di metodi alternativi (EURL ECVAM), affidandogli il compito di coordinare e promuovere lo sviluppo e l'uso di alternative alle procedure con animali (European Parliament and Council, 2010, Art. 48; Hartung, 2010).

La Direttiva stabilisce, inoltre, che nessun progetto che preveda l'uso di animali ai fini sperimentali possa essere realizzato senza una preventiva autorizzazione rilasciata dall'autorità competente (European Parliament and Council, 2010, Art. 36). Il progetto deve essere sottoposto a una valutazione che verifichi (European Parliament and Council, 2010, Art. 38):

- La giustificazione scientifica o educativa del progetto o la sua previsione per legge.
- La conformità al principio delle 3R.
- La classificazione della gravità delle procedure.
- Un'analisi danno-beneficio, per valutare se il danno arrecato agli animali è giustificato dai benefici attesi, tenendo conto anche di considerazioni etiche.

Le procedure devono essere eseguite esclusivamente nell'ambito di un progetto autorizzato e secondo quanto specificato nell'autorizzazione stessa (European Parliament and Council, 2010, Art. 12.2). La Direttiva prevede anche una procedura amministrativa semplificata per progetti che utilizzano metodi consolidati per scopi di produzione o diagnostici (European Parliament and Council, 2010, Art. 42; Hartung, 2010).

In aggiunta, la Direttiva introduce anche un sistema di classificazione della gravità delle procedure, basato sul livello di dolore, sofferenza, stress o danno prolungato che si prevede l'animale possa subire (European Parliament and Council, 2010, Annex VIII; Olsson et al., 2016).

Le categorie di gravità sono (European Parliament and Council, 2010, Annex VIII, Section I):

- Non risveglio: procedure eseguite interamente in anestesia generale da cui l'animale non recupera la coscienza.
- Lieve: procedure che causano dolore, sofferenza o distress di breve durata e di lieve entità.
- Moderata: procedure che causano dolore, sofferenza o distress moderati e di breve durata, oppure lievi ma di lunga durata.
- Grave: procedure che causano dolore, sofferenza o distress intensi, oppure moderati ma di lunga durata.

Sono vietate dalla Direttiva le procedure che comportano dolore, sofferenza o stress intensi che possono protrarsi e non possono essere alleviati (European Parliament and Council, 2010, Art. 15.2; Recital 23). I progetti che utilizzano primati non umani, cani e gatti o che comportano

procedure classificate come gravi sono soggetti a una valutazione retrospettiva obbligatoria (European Parliament and Council, 2010, Art. 39.2).

La Direttiva impone che lo svolgimento di un progetto autorizzato sia condotto in stabilimenti con specifiche caratteristiche e approvati dalle autorità competenti.

Infatti, nella Direttiva, sono elencate in modo dettagliato e specifico per specie le caratteristiche e i requisiti minimi da rispettare per gli stabilimenti utilizzatori, allevatori e fornitori di animali utilizzati a fini scientifici. In ogni stabilimento autorizzato devono essere presenti le seguenti figure (European Parliament and Council, 2010; Olsson et al., 2016):

- Personale adeguatamente formato: il personale deve possedere un'istruzione e una formazione adeguate per poter svolgere le funzioni di realizzazione delle procedure, progettazione, cura degli animali o soppressione (European Parliament and Council, 2010, Art. 23).
- Veterinario designato: ciascun allevatore, fornitore o utilizzatore deve disporre di un veterinario con competenze in medicina degli animali da laboratorio (European Parliament and Council, 2010, Art. 25).
- Organismo per il benessere animale: deve essere istituito un Organismo Preposto al Benessere Animale, con compiti di consulenza, monitoraggio e promozione delle 3R (European Parliament and Council, 2010, Art. 26-27).
- Standard minimi di alloggiamento e cura: definiti nell'Allegato III della Direttiva, questi standard sono diventati vincolanti e non più semplici linee guida (Hartung, 2010; European Parliament and Council, 2010, Annex III).
- Registri e tracciabilità: devono essere tenuti registri dettagliati degli animali, della loro provenienza e del loro utilizzo (European Parliament and Council, 2010, Art. 30-31).

La Direttiva prevede inoltre ispezioni regolari degli stabilimenti, con una frequenza basata sull'analisi del rischio, e la possibilità di effettuare ispezioni a sorpresa (European Parliament and Council, 2010, Art. 34; Olsson et al., 2016).

2.2 Il D.Lgs. 26/2014

In Italia, la Direttiva 2010/63/UE è stata recepita con il Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26 (Ministero della Salute, n.d.). Il D.Lgs. 26/2014 non si limita a recepire fedelmente la normativa europea, ma introduce disposizioni discrezionali più restrittive, in difformità rispetto alla Direttiva stessa.

Il D.Lgs. 26/2014 stabilisce misure relative alla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici o educativi, disciplinando (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 1, comma 1):

- a) La sostituzione, la riduzione dell'uso di animali nelle procedure e il perfezionamento delle tecniche di allevamento, di alloggiamento, di cura e di impiego degli animali nelle procedure.
- b) La provenienza, l'allevamento, l'identificazione, la cura, l'alloggiamento e la soppressione degli animali.
- c) Le attività degli allevatori, dei fornitori e degli utilizzatori.
- d) La valutazione e l'autorizzazione dei progetti che prevedono l'uso degli animali nelle procedure.

L'utilizzo degli animali ai fini scientifici o educativi è consentito soltanto quando, per ottenere il risultato ricercato, non sia possibile utilizzare altro metodo o una strategia di sperimentazione scientificamente valida, ragionevolmente e praticamente applicabile che non implichi l'impiego di animali vivi (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 1, comma 2).

Il decreto si applica ai seguenti animali (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 1, comma 3):

- a) Animali vertebrati vivi non umani, comprese:
 - a. Forme larvali capaci di alimentarsi autonomamente.
 - b. Forme fetali di mammiferi a partire dall'ultimo terzo del loro normale sviluppo.
- b) Cefalopodi vivi.

Le disposizioni del decreto si estendono anche agli animali impiegati o destinati a essere impiegati in procedure sperimentali, nonché a quelli allevati specificamente affinché i loro organi o tessuti

vengano utilizzati per scopi scientifici. Tale disciplina si applica anche qualora gli animali si trovino in uno stadio di sviluppo antecedente a quello previsto, a condizione che vengano mantenuti in vita oltre tale fase e che sussista la possibilità che possano sperimentare dolore, sofferenza, stress o danni di lunga durata (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 1, comma 4). L'inclusione dei cefalopodi e l'estensione alle forme fetali riflettono le disposizioni della Direttiva europea, basate su evidenze scientifiche riguardanti la loro capacità di provare dolore e sofferenza (European Parliament and Council, 2010, Recital 8-9).

L'articolo 3 del D.Lgs. 26/2014 fornisce le definizioni chiave, in linea con quanto stabilito dalla Direttiva 2010/63/UE (European Parliament and Council, 2010, Art. 3; Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 3):

- a) Procedura: qualsiasi uso, invasivo o non invasivo, di un animale ai fini sperimentali o ad altri fini scientifici dal risultato noto o ignoto, o ai fini educativi, che possa causare all'animale un livello di dolore, sofferenza, distress o danno prolungato equivalente o superiore a quello provocato dall'inserimento di un ago secondo le buone prassi veterinarie.
- b) Progetto: un programma di lavoro con un preciso obiettivo scientifico che prevede il ricorso a una o più procedure.
- c) Stabilimento: qualsiasi impianto, edificio, gruppo di edifici o altri locali autorizzati all'allevamento e/o alla stabulazione di animali per le finalità del decreto.
- d) Allevatore: la persona fisica o giuridica autorizzata ad allevare animali destinati a essere utilizzati nelle procedure o per impiegare i loro organi o tessuti a fini scientifici.
- e) Fornitore: la persona fisica o giuridica, diversa dall'allevatore, autorizzata a fornire animali destinati a essere utilizzati nelle procedure.
- f) Utilizzatore: la persona fisica o giuridica autorizzata a porre in esercizio uno stabilimento in cui vengono eseguite le procedure.

Chiunque intende porre in esercizio uno stabilimento di allevamento, di fornitura o di utilizzazione deve presentare domanda di autorizzazione all'autorità competente (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 20). Il rilascio dell'autorizzazione è subordinato alla verifica ispettiva del rispetto dei requisiti previsti dagli articoli 22, 23, 24, 25 e dagli allegati III e VIII del decreto e ha una durata di sei anni (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 20, comma 3 e comma 5).

Il D.Lgs. 26/2014 prevede che i progetti di ricerca che prevedono l'utilizzo di animali non possano essere eseguiti senza la preventiva autorizzazione del Ministero della Salute (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 31, comma 1). La domanda di autorizzazione deve essere inoltrata dall'Organismo Preposto al Benessere Animale (OpBA), il quale ne fa una prevalutazione emettendo un parere motivato vincolante. L'OpBA tramite la Banca Dati Telematica della Sperimentazione Animale trasmette tutta la documentazione al Ministero della Salute che ha l'autorità di approvare il progetto. (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 31, comma 2; Ministero della Salute, n.d.).

La documentazione trasmessa al ministero deve contenere:

- a) La proposta del progetto.
- b) La sintesi non tecnica del progetto.
- c) Il modulo di cui all'allegato VI del decreto.
- d) Il parere motivato positivo dell'OpBA.
- e) Moduli di autocertificazione: Allegato D (Autocertificazione assenza conflitti di interesse da parte del Responsabile di Progetto); allegato B (autocertificazione di un membro OpBA sui requisiti di formazione del personale che partecipa al progetto) e Allegato E (assenza di condanne penali da parte del Responsabile di progetto).

L'autorizzazione del progetto ha una durata non superiore a cinque anni (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 31, comma 10).

Il Ministero della Salute sottopone il progetto a una valutazione tecnico-scientifica da parte dell'Istituto Superiore di Sanità o di altri enti tecnico-scientifici (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 31, comma 3). La valutazione deve tener conto di molteplici aspetti, tra cui (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 31, comma 4):

- a) La preventiva valutazione degli scopi del progetto che giustificano l'uso dell'animale.
- b) La presenza del parere positivo dell'OpBA.
- c) L'analisi dei danni e dei benefici derivanti dal progetto, tenendo conto anche di considerazioni di natura etica.
- d) La classificazione della gravità delle procedure.
- e) La necessità di eseguire una valutazione retrospettiva del progetto.

Il decreto, inoltre, prevede che le autorità competenti effettuino ispezioni regolari sugli allevatori, fornitori, utilizzatori e i rispettivi stabilimenti, per verificare la conformità con i requisiti del decreto (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 30, comma 1). La frequenza delle ispezioni è determinata in base all'analisi del rischio e una percentuale appropriata deve essere effettuata senza preavviso (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 30, commi 3 e 5). Ogni allevatore, fornitore o utilizzatore deve tenere un registro non modificabile contenente informazioni dettagliate per la tracciabilità degli animali, aggiornato a cadenza settimanale e conservato per un minimo di cinque anni (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 27). Per cani, gatti e primati non umani è richiesto un fascicolo individuale (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 28).

2.3 Organi responsabili e figure professionali

Il Ministero della Salute rappresenta l'autorità competente principale per l'attuazione del D.Lgs. 26/2014, con compiti di autorizzazione (stabilimenti utilizzatori e progetti), vigilanza, controllo, nomina del Comitato Nazionale per la protezione degli animali usati a fini scientifici e raccolta dei dati statistici (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 4, 31, 38, 39; Ministero della Salute, n.d.).

Il D.Lgs. 26/2014 individua diverse autorità competenti in base al tipo di attività (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 4): il Ministero della Salute (per stabilimenti utilizzatori e progetti), il Comune (per stabilimenti di allevamento o fornitura), l'Azienda Sanitaria Locale (per vigilanza e ispezioni) e la Regione (per alcune attività prevalentemente a carattere formativo e sanzioni amministrative).

L'Organismo Preposto al Benessere Animale (OpBA), invece, è un organismo indipendente istituito presso ciascun allevatore, fornitore o utilizzatore, con il compito di vigilare sull'applicazione delle normative e delle procedure volte a garantire il benessere degli animali utilizzati a fini scientifici (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 25; Ministero della Salute, n.d.). L'OpBA svolge compiti di consulenza, monitoraggio, promozione delle 3R, formazione e attivazione di nuovi corsi di formazione accreditati, rilascio di parere motivato obbligatorio sui progetti di ricerca (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 26). Inoltre, l'OpBA è l'unico ente

che comunica con il Ministero tramite il servizio telematico della Banca Dati Sperimentale Animale (BDNS). La sua composizione minima è: un responsabile del benessere, un medico veterinario designato e da uno o più membri scientifici (per gli utilizzatori) (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 25, comma 2).

Ciascun allevatore, fornitore o utilizzatore deve, quindi, disporre di un medico veterinario designato, esperto in medicina degli animali da laboratorio, che definisce le buone norme per mantenere il benessere e le modalità di trattamento terapeutico degli animali (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 24; European Parliament and Council, 2010, Art. 25). Il veterinario designato ha un ruolo di rilievo nella valutazione del benessere animale e nella definizione dei protocolli sperimentali.

Per quanto riguarda il responsabile del benessere animale, ciascun allevatore, fornitore o utilizzatore ne possiede uno o più di uno. Sono, appunto, responsabili del benessere, della cura degli animali e del funzionamento delle attrezzature di uno o più stabilimenti (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 3, comma 1, lettera h). Questa figura ha anche compiti di supervisione, formazione del personale e garanzia del rispetto degli standard di benessere animale (European Parliament and Council, 2010, Art. 24).

Il responsabile del progetto, invece, è la persona fisica titolare dell'autorizzazione del progetto, responsabile degli aspetti amministrativi e scientifici e della realizzazione dei progetti in conformità all'autorizzazione concessa (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 3, comma 1, lettera g; European Parliament and Council, 2010, Art. 24.2).

Il D.Lgs. 26/2014 richiede anche la presenza di personale addetto alla cura, manipolazione e soppressione degli animali che deve possedere un livello di istruzione e formazione adeguato, acquisito, mantenuto e dimostrato secondo le modalità definite con decreto del Ministro della Salute (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 23). Il personale opera sotto supervisione finché non dà prova del possesso delle competenze richieste (Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Art. 23, comma 4; European Parliament and Council, 2010, Art. 23.2).

CAPITOLO 3 - Il principio delle 3R nella ricerca con roditori

3.1 Introduzione ed Evoluzione Storica dei Principi delle 3R

Il dibattito etico e scientifico concernente l'impiego di modelli animali nella ricerca biomedica e tossicologica ha subito una profonda trasformazione negli ultimi decenni. Le linee guida fondamentali del panorama bioetico applicato alla ricerca affondano le proprie radici nel lavoro di Russell e Burch del 1959, *The Principles of Humane Experimental Technique*, all'interno del quale vennero definiti originariamente i principi delle 3R: *Replacement* (Sostituzione), *Reduction* (Riduzione) e *Refinement* (Affinamento). Tradizionalmente, l'approccio scientifico si basava sul presupposto che un migliore benessere animale coincidesse inevitabilmente con una migliore qualità del dato scientifico ottenuto. Tuttavia, l'interpretazione classica di questi concetti si è rivelata talvolta troppo rigida o vaga rispetto alle attuali conoscenze sulla capacità di provare sensazioni degli animali e alle emergenti tecnologie biomediche. Le definizioni originali del 1959 sono state spesso oggetto di fraintendimenti metodologici da parte dei ricercatori moderni, rendendo necessaria una ricalibrazione degli obiettivi fondamentali delle 3R alla luce del progresso scientifico contemporaneo (Tannenbaum e Bennett, 2015). Oggi assistiamo ad un decisivo cambiamento di paradigma: l'attenzione si sta progressivamente spostando dai test tossicologici tradizionali in vivo verso approcci predittivi in vitro e in silico, maggiormente focalizzati sulla biologia e sulla fisiopatologia umana. Questo avanzamento concettuale ha ridefinito le 3R da semplici strumenti tecnici di controllo a un quadro dinamico ed evolutivo. Inoltre, emerge con chiarezza che le 3R non operano in un quadro puramente etico: la validità scientifica e la robustezza metodologica della ricerca devono andare di pari passo con la tutela bioetica, integrando la riduzione e l'affinamento con stringenti criteri di trasparenza, preregistrazione dei protocolli e accuratezza statistica per contrastare la crisi globale della riproducibilità del dato (Strech e Dirnagl, 2019). Questa transizione si inserisce in maniera integrale all'interno della visione One Health, promuovendo un approccio combinato volto a bilanciare in modo sostenibile la salute umana, animale e dell'ecosistema.

3.2 Ridefinizione delle 3R nel Contesto Scientifico Moderno

La comunità scientifica internazionale, attraverso network di professionisti come la COST Action IMPROVE, ha recentemente proposto un aggiornamento terminologico e operativo delle definizioni convenzionali delle 3R per allinearle alla Direttiva Europea 2010/63/UE e agli standard odierni del NC3Rs britannico (*National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research*).

Sostituzione (Replacement)

Definizione classica: Sostituzione degli animali superiori coscienti e viventi con materiale insenziente.

Approccio contemporaneo: Conduzione di attività di ricerca, test regolatori ed educazione evitando completamente l'uso di animali. Questo include l'adozione delle cosiddette *New Approach Methodologies* (NAMs). Il concetto si estende anche all'eliminazione di tutti i materiali biologici ottenuti o derivati da animali sacrificati, come sieri di coltura, anticorpi animali o matrici extracellulari, a favore di alternative interamente sintetiche o umane.

Riduzione (Reduction)

Definizione classica: Riduzione del numero di animali utilizzati per ottenere una data quantità di informazioni con una specifica precisione.

Approccio contemporaneo: Minimizzazione del numero di animali necessari per fornire informazioni utili, consistenti, affidabili e riproducibili. La responsabilità non è più affidata esclusivamente al disegno sperimentale del singolo ricercatore tramite il calcolo del campione statistico, ma coinvolge l'intera comunità scientifica mediante la trasparenza metodologica, la condivisione *open-access* dei dati (inclusi i risultati negativi) e l'armonizzazione internazionale delle procedure per evitare duplicazioni di protocolli.

Affinamento (Refinement)

Definizione classica: Riduzione dell'incidenza o della severità delle procedure applicate agli animali.

Approccio contemporaneo: Qualsiasi misura volta a migliorare il benessere complessivo o a minimizzare il dolore, la sofferenza, lo stress o il danno prolungato. Trova applicazione lungo

l'intero ciclo di vita dell'animale, dall'allevamento alla stabulazione, fino alla scelta rigorosa di endpoint umanitari precoci (*humane endpoints*).

3.3 Metodologie ad Approccio Alternativo (NAMs)

Il progresso biotecnologico e ingegneristico ha permesso lo sviluppo di modelli predittivi ad alta precisione che riducono i costi operativi e superano i limiti della riproducibilità interspecifica dei dati in vivo (Tabella 1). L'evoluzione delle NAMs si muove verso una comprensione dei meccanismi d’azione della tossicità e della patologia cellulare, abbandonando l'approccio empirico basato sull'animale nella sua totalità (Rovida et al., 2020).

Metodologia alternativa	Caratteristiche principali	Vantaggi/limiti
Modelli Cellulari 3D e Organoidi	Sistemi di coltura avanzati (es. sferoidi tumorali) che mimano l'eterogeneità cellulare e l'architettura del microambiente tissutale umano (Poh e Stanslas, 2024)	Maggiore precisione predittiva per la medicina oncologica personalizzata rispetto ai tradizionali monolayer 2D (Poh e Stanslas, 2024).
Organ-on-Chip (OC) e Sistemi Microfisiologici (MPS)	Sistemi microfluidici bioingegnerizzati che replicano le forze fisiche e la fisiopatologia d'organo a livello umano (Marx et al., 2020)	Identificazione precoce della tossicità epatica o cardiaca indotta da farmaci (DILI), spesso non rilevata nei test canini o murini (Poh e Stanslas, 2024).
Modelli In Silico e QSAR	Simulazioni computazionali e modelli di Relazione Quantitativa Struttura-Attività (QSAR) bidimensionali e multidimensionali (3D/4D) (Rovida et al., 2021).	Permettono lo screening virtuale precoce e il <i>read-across</i> di tossicità ed emendamenti genotossici (" <i>fail early, fail cheap</i> ") (Poh e Stanslas, 2024).

<i>Saggio CAM (In Ovo)</i>	Impiego della membrana corioallantoidea di embrioni di pollo prima del raggiungimento dello stadio regolamentato come animale (EDD 17) (Poh e Stanslas, 2024).	Modello non innervato ottimale per lo studio dell'angiogenesi, della rigenerazione ossea e della guarigione delle ferite cutanee (Poh e Stanslas, 2024).
<i>Zebrafish (Modello Larvale)</i>	Impiego di embrioni o larve di <i>Danio rerio</i> fino a 5 giorni post-fertilizzazione, prima dello stadio di nutrizione indipendente (Poh e Stanslas, 2024).	Omologia genetica del 70% con l'essere umano; ideale per lo screening di tossicità acuta e patologie neurologiche ad alto rendimento (Poh e Stanslas, 2024).

Tabella 1: Esempi di NAMs

3.4 Il Quadro Regolatorio Internazionale e l'Accettazione Istituzionale

L'implementazione delle 3R varia significativamente su scala globale a seconda dei quadri legislativi nazionali, sebbene permanga la necessità di un'armonizzazione per evitare barriere nello sviluppo dei farmaci e nella valutazione del rischio chimico.

Unione Europea

La Direttiva 2010/63/UE impone agli Stati membri l'obbligo giuridico di verificare la disponibilità di metodi alternativi scientificamente soddisfacenti prima di autorizzare qualsiasi procedura in vivo. Per favorire la validazione biologica e l'accettazione regolatoria dei metodi non animali, l'UE si avvale di organismi specializzati quali *l'European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing* (EURL ECVAM) e la *European Union Network of Laboratories for the Validation of Alternative Methods* (EU-NETVAL). Come evidenziato dalle linee guida dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), l'integrazione delle NAMs nella valutazione del rischio delle sostanze chimiche rappresenta una priorità strategica, sebbene sussistano sfide scientifiche per la standardizzazione dei protocolli industriali su larga scala (Schmeisser et al. 2023).

Stati Uniti

Nel gennaio 2023, l'entrata in vigore del *FDA Modernization Act 2.0* ha segnato una svolta storica, rimuovendo l'obbligo tassativo di testare tutti i nuovi candidati farmaci sugli animali prima di accedere alle sperimentazioni cliniche umane. Questo cambiamento riflette una transizione di lungo termine promossa dagli enti regolatori americani verso strategie di sperimentazione non clinica integrate (Avila et al., 2020). La *Food and Drug Administration* (FDA) sostiene attivamente il *New Alternative Methods Program*, allocando fondi specifici per lo sviluppo di saggi computazionali e cellulari validati in grado di sostituire i modelli animali tradizionali.

Paesi Asiatici e Altre Realtà

Mentre l'adozione della valutazione etica tramite i comitati IACUC (*Institutional Animal Care and Use Committee*) è uno standard consolidato in Occidente, in paesi come la Cina l'introduzione formale delle 3R ha avuto inizio nei primi anni '90. Attualmente, le linee guida del Ministero della Scienza e della Tecnologia (MOST) incoraggiano la condivisione dei dati scientifici mediante appositi database transnazionali per ridurre il numero di animali impiegati. In altri contesti, come la Malesia (tramite l'*Animal Welfare Act 2015*) e Singapore (linee guida del *National Advisory Committee for Laboratory Animal Research*), l'ottenimento delle licenze per le strutture di ricerca è severamente vincolato a ispezioni annuali del benessere animale e all'adozione del sistema IACUC.

In conclusione, l'accettazione regolatoria internazionale delle metodiche alternative è supportata anche da linee guida globali come quelle dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e del *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH). Queste ultime raccomandano la rimozione dei test in vivo ridondanti per l'approvazione dei farmaci biosimilari qualora sia dimostrata un'elevata somiglianza fisico-chimica e una totale equivalenza biologica in vitro con il prodotto di riferimento, riducendo l'onere sperimentale sulla componente animale.

CAPITOLO 4 - Struttura e organizzazione di un allevamento sperimentale di roditori

4.1 Definizione di stabulario e allevamento sperimentale

La moderna ricerca in vivo richiede una rigida standardizzazione delle strutture destinate a ospitare gli animali da laboratorio. In ambito normativo e gestionale, è fondamentale operare una netta distinzione tra le attività di allevamento, mantenimento e utilizzazione, concetti che sottendono responsabilità e autorizzazioni ministeriali differenti secondo il D.Lgs. 26/2014. L'allevamento identifica l'attività biologica e gestionale finalizzata alla riproduzione e alla selezione genetica degli animali; il mantenimento si riferisce alla custodia e alla cura degli animali non ancora inseriti in procedure o in fase di post-procedura; l'utilizzazione, infine, comprende l'impiego attivo dell'animale all'interno di un protocollo sperimentale autorizzato.

Dal punto di vista dello status microbiologico, gli stabulari si dividono principalmente in convenzionali e a barriera SPF (*Specific Pathogen Free*). Le strutture convenzionali, oggi progressivamente ridotte o limitate a specifiche linee di ricerca, non prevedono barriere microbiologiche assolute contro i patogeni opportunisti, esponendo le colonie a variabili biologiche che possono alterare la riproducibilità e l'accuratezza dei dati sperimentali a causa di infezioni subcliniche (Nicklas et al., 2002). Al contrario, gli stabulari SPF operano sotto un regime di isolamento rigoroso, garantendo l'assenza di una lista definita di agenti patogeni e parassiti in conformità con le raccomandazioni internazionali FELASA (Mähler et al., 2014). Il mantenimento dello status SPF è affidato a barriere sanitarie complesse, di natura meccanica, chimica e fisica, che filtrano l'aria, sterilizzano i materiali in ingresso e impongono l'utilizzo di DPI al personale. All'interno di questi ambienti, una gestione particolare è riservata alle unità per animali geneticamente modificati (GEM), dove il monitoraggio non è solo microbiologico ma anche genetico, per preservare l'integrità del fenotipo e del genotipo riducendo la deriva genica. L'organizzazione degli spazi prevede inoltre aree di quarantena indispensabili per gli animali introdotti in stabulario provenienti da altri stabilimenti. Infine, sono presenti aree procedurali dedicate all'esecuzione di procedure, mantenute fisicamente distinte dalle sale di stabulazione per evitare che lo stress acustico o olfattivo legato alle manipolazioni si rifletta sulle colonie a riposo (ad esempio: laboratori o sale operatorie).

4.2 Requisiti strutturali

La progettazione di un moderno stabulario deve rispondere a precisi requisiti volti a garantire il benessere animale e la sicurezza degli operatori, minimizzando le interferenze ambientali (National Research Council, 2011). I locali di stabulazione veri e propri devono presentare superfici lavabili, impermeabili e prive di fessure per consentire una sanificazione profonda. Ad essi si affiancano i locali di lavaggio, che rappresentano il cuore logistico e la principale fonte di carico termico e acustico dello stabulario; per questo motivo devono essere isolati acusticamente per non creare stress ai roditori (Hessler e Leary, 2002). Una zona isolata dello stabulario è dedicata alla conservazione di mangimi e lettieri, un ambiente a temperatura e umidità controllate per prevenire la degradazione dei nutrienti e la proliferazione di micotossine o parassiti. La compartimentazione strutturale impone anche, come menzionato precedentemente, la presenza del locale di quarantena per l'accettazione dei nuovi arrivi, del locale procedure per le attività sperimentali e di un locale magazzino per lo stoccaggio dei materiali di consumo vari. L'impianto tecnologico più critico è rappresentato dai sistemi di ventilazione e filtrazione (*Heating, Ventilation and Air Conditioning*, HVAC). In conformità con la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 2011), l'impianto deve garantire tra i 10 e i 15 ricambi d'aria all'ora, con una filtrazione assoluta HEPA in immissione per le aree protette. Il controllo degli accessi, mediato da badge elettronici e sistemi a doppia porta interbloccata (*interlocking doors*), è fondamentale per assicurare il biocontenimento e la biosicurezza. Tutta la logistica interna è infine organizzata con la netta separazione dei flussi pulito/scorco: i corridoi e i percorsi del materiale sterile (gabbie pronte, cibo, lettiera pulita) non devono mai incrociare i percorsi del materiale sporco o dei rifiuti biologici, riducendo drasticamente il rischio di contaminazione crociata per via aerea o da contatto. Negli stabulari SPF i percorsi degli operatori e del materiale dalla zona pulita alla zona sporca sono molti più rigorosi e controllati rispetto agli stabilimenti convenzionali. Gli accessi sono dotati di docce ad aria o armadi igienizzanti in cui l'operatore, dopo aver indossato i DPI, subisce un'ulteriore disinfezione per aumentare il livello di biosicurezza dello stabulario.

4.3 Sistemi di stabulazione

L'evoluzione tecnologica dei sistemi di stabulazione ha modificato profondamente la gestione quotidiana e l'efficienza degli stabulari. Le gabbie convenzionali a cielo aperto, posizionate su rack aperti, espongono gli animali direttamente al macro-ambiente della stanza e sono ormai presenti esclusivamente in stabilimenti convenzionali. Pur offrendo una facilità di ispezione visiva, presentano notevoli svantaggi sanitari dovuti alla rapida diffusione aerea di agenti patogeni e un elevato rischio occupazionale per gli operatori, esposti costantemente agli allergeni dei roditori (Reeb-Whitaker et al., 2001). Il moderno standard di riferimento è costituito dalle gabbie ventilate individualmente (IVC), collegate a rack ventilati dotati di motori indipendenti per l'immissione e l'estrazione forzata dell'aria. I sistemi IVC, presenti in stabulari SPF, offrono un biocontenimento eccellente sia a livello di singola gabbia, proteggendo l'animale, sia verso l'ambiente esterno, proteggendo quindi l'operatore (Reeb-Whitaker et al., 2001). Tuttavia, dal punto di vista del Refinement, l'alto tasso di ricambi d'aria nelle gabbie e la micro-corrente generata dai flussi di ventilazione possono talvolta influenzare il comportamento e lo stress termico dei roditori, richiedendo un posizionamento accurato delle bocchette e l'inserimento di materiale di arricchimento (es. capannine, carta da nido) per permettere agli animali di termoregolarsi (Kallnik et al., 2007). Per esigenze di massimo isolamento microbiologico (es. ceppi *germ-free* o immunodeficienti severi), si ricorre agli isolatori, strutture a barriera totale sigillate dove ogni manipolazione avviene tramite guanti ermetici integrati nella parete di plastica trasparente.

L'analisi comparativa tra questi sistemi evidenzia un preciso bilancio tra vantaggi e svantaggi gestionali, sanitari ed energetici. Se le IVC e gli isolatori garantiscono un'eccellente sicurezza sanitaria e la possibilità di densificare i rack aumentando la capacità ricettiva dello stabulario, l'impatto energetico dei motori di ventilazione e dei sistemi HVAC centralizzati è elevato. La ricerca della sostenibilità negli stabulari moderni si sta orientando verso l'integrazione degli scarichi dei rack IVC direttamente nel sistema di estrazione dell'edificio, riducendo la necessità di climatizzare massicciamente l'intero volume d'aria dei locali di stabulazione e abbattendo significativamente l'impronta carbonica della struttura, coerentemente con la politica europea di ottimizzazione delle risorse. Inoltre, l'adozione di screening ambientali molecolari sui filtri delle IVC (*Exhaust Air Dust Testing*, EDT) permette oggi di eliminare i tradizionali animali sentinella. Come dimostrato in uno studio di Williams et al. (2024), il test PCR sui filtri dell'aria di scarico, sia

a livello di plenum del rack che, in particolare, a livello di gabbia, rileva un numero significativamente maggiore di agenti patogeni e su un numero maggiore di rack rispetto ai topi sentinella esposti a lettiera sporca. Questo approccio non solo migliora la sensibilità e l'affidabilità del monitoraggio sanitario, ma riduce drasticamente il carico di lavoro per il personale e il numero di animali vivi utilizzati a fini di sorveglianza, rappresentando un avanzamento concreto verso gli obiettivi di refinement e reduction promossi dalle linee guida internazionali e dal D.Lgs. 26/2014.

4.4 Parametri ambientali

Il controllo e la standardizzazione del micro e macro-ambiente all'interno dei locali di stabulazione costituiscono un prerequisito fondamentale per la stabilità fisiologica dei roditori e per la riproducibilità del dato scientifico (National Research Council, 2011). La temperatura ideale deve essere mantenuta in un intervallo stretto, generalmente compreso tra 20°C e 24°C per i roditori adulti. Oscillazioni termiche repentine possono indurre alterazioni metaboliche e immunitarie marcate; tuttavia, va considerato che all'interno delle gabbie IVC il micro-ambiente tende a registrare temperature leggermente superiori rispetto al macro-ambiente della stanza. Un altro parametro fondamentale e strettamente legato alla temperatura è l'umidità relativa, che dovrebbe avere valori compresi tra il 45% e il 65%. Valori costantemente inferiori al 40% espongono i topi al rischio di insorgenza della *ringtail* (necrosi anulare della coda), mentre tassi di umidità troppo elevati favoriscono la proliferazione batterica e la degradazione della lettiera. I sistemi di ventilazione e il calcolo dei ricambi d'aria (fissati tra i 10 e i 15 ricambi/ora) svolgono la duplice funzione di apportare ossigeno e rimuovere i gas nocivi. La gestione della pressione differenziale tra i diversi locali è fondamentale per il biocontenimento e la bio-esclusione: i locali di stabulazione che ospitano animali SPF o immunodeficienti sono mantenuti in pressione positiva rispetto ai corridoi per evitare l'ingresso di contaminanti esterni, mentre i locali di quarantena o i laboratori in cui si manipolano agenti patogeni o sostanze volatili operano in pressione negativa per impedire la fuga di vettori o allergeni verso l'esterno (Hessler & Leary, 2002). L'illuminazione deve essere rigorosamente regolata per intensità e fotoperiodo, solitamente impostato su cicli regolari di 12 ore di luce e 12 ore di buio. Poiché i roditori da laboratorio sono specie prevalentemente notturne e gli albinisti risultano particolarmente suscettibili alla fototossicità, l'intensità luminosa a livello della gabbia non dovrebbe superare i 60 lumen per prevenire la degenerazione retinica progressiva. Ugualmente critico è il controllo di

rumore e vibrazioni: i roditori percepiscono frequenze ultrasoniche (oltre i 20 kHz) non udibili dall'uomo. Rumori acuti o vibrazioni continue causate dai motori degli impianti di condizionamento o dalle lavatrici industriali limitrofe inducono risposte di stress cronico, alterando i livelli corticosteroidi ed interferendo con i risultati sperimentali. La qualità dell'aria viene infine compromessa dall'accumulo di ammoniaca e polveri. L'ammoniaca viene prodotta dalla degradazione batterica dell'urea presente nell'urina; la soglia critica per la sua presenza è di 25 ppm, e una volta superata esercita un'azione fortemente irritante sulle mucose oculari e sull'epitelio respiratorio, predisponendo l'animale a infezioni polmonari opportunistiche. L'impiego di gabbie IVC riduce drasticamente la concentrazione di questo gas nel macro-ambiente, ma richiede un monitoraggio attento dei cicli di cambio della lettiera per preservare il micro-ambiente *intracage* (Reeb-Whitaker et al., 2001).

4.5 Biosicurezza

La biosicurezza in uno stabulario sperimentale comprende l'insieme delle misure operative e strutturali finalizzate a prevenire l'introduzione, il trattenimento e la diffusione di agenti patogeni. Il primo grado di difesa è rappresentato dall'accesso controllato tramite sistemi informatizzati di autenticazione, che limitano l'ingresso al solo personale autorizzato e specificamente addestrato. Gli operatori e i ricercatori costituiscono uno dei principali vettori di contaminazione. Per questo motivo l'uso corretto dei Dispositivi di Protezione Individuale (DPI), quali tute monouso, calzari, cuffie, guanti e mascherine filtranti (FFP2 o FFP3), è obbligatorio prima di varcare le soglie delle zone produttive. Le procedure di accesso in area controllata seguono un protocollo a cascata all'interno di zone filtro a pressione controllata, dove si transita dal vestiario civile a quello sterile da barriera. La prevenzione si attua anche attraverso la quarantena, un'area isolata in cui i roditori introdotti da altri stabilimenti o da fornitori non certificati vengono stabulati per un periodo minimo variabile (solitamente dalle 3 alle 6 settimane) per essere sottoposti a screening clinici e sierologici completi prima dell'integrazione nelle sale principali. La gestione degli animali introdotti da altri stabilimenti richiede una stretta collaborazione tra i Medici Veterinari Designati delle strutture coinvolte, tramite l'analisi preventiva dell'HMER (*Health Monitoring Report*). Parallelamente, i flussi di logistica interna prevedono protocolli stringenti di decontaminazione e sanificazione di tutte le apparecchiature, delle superfici e dei materiali di consumo (mangime e lettiera), che vengono preferibilmente autoclavati o trattati mediante cicli di perossido di

idrogeno gassoso (*Vaporized Hydrogen Peroxide* – VHP) prima dell'introduzione nell'area confinata. Il controllo di vettori e contaminanti esterni consiste, invece, nella prevenzione delle infestazioni da insetti o roditori selvatici, potenziali portatori di patogeni esogeni eradicati dagli allevamenti scientifici. Infine, l'efficacia delle barriere microbiologiche – siano esse fisiche come gli isolatori, o dinamiche come i flussi laminari e le IVC – viene validata continuamente attraverso programmi di monitoraggio sanitario che verificano l'assenza dei patogeni elencati nelle linee guida FELASA (Mähler et al., 2014).

Esiste un sistema di classificazione della biosicurezza, che si applica sia ai laboratori che non ospitano animali (Biosafety Level, BSL), che agli stabilimenti nei quali sono presenti animali utilizzati ai fini sperimentali (Animal Biosafety Level, ABSL). Questo sistema definisce quattro livelli di contenimento in base al rischio degli agenti patogeni manipolati. L'ABSL-1 si applica ad agenti non patogeni e richiede solo pratiche standard di cura animale. L'ABSL-2, per agenti a rischio moderato, impone l'accesso limitato e l'uso di cappe a flusso laminare per le procedure che generano aerosol (Lee et al., 2024). L'ABSL-3, necessario per agenti che possono causare malattie gravi per via inalatoria, introduce barriere fisiche come il flusso d'aria negativo e l'autoclave in loco per i rifiuti (Klages, 2022). Infine, l'ABSL-4, il massimo livello di sicurezza, è riservato ad agenti esotici ad alta letalità e richiede tute a pressione positiva e decontaminazione totale dei rifiuti (Klages, 2022). La scelta del livello appropriato è cruciale per proteggere operatori e ambiente senza compromettere l'integrità della sperimentazione (Klages, 2022).

4.6 Classificazione sanitaria degli animali

L'evoluzione della medicina degli animali da laboratorio ha permesso di categorizzare i roditori in base al loro profilo microbiologico, definendo con precisione il livello di standardizzazione biologica del modello sperimentale. Storicamente, gli animali convenzionali rappresentano i soggetti allevati senza particolari restrizioni nei confronti della flora microbica ambientale. Questi animali ospitano una flora batterica, virale e parassitaria non definita che può includere patogeni sia primari che opportunisti. Per tale ragione, il loro impiego nella ricerca biomedica moderna è fortemente limitato, poiché l'interazione tra l'agente infettivo silente e il sistema immunitario dell'ospite introduce variabili incontrollabili che inficiano la validità scientifica dell'esperimento (Nicklas et al., 2002).

La classe prevalente nella sperimentazione contemporanea è costituita dagli animali SPF (*Specific Pathogen Free*). Come dettagliato dalle raccomandazioni FELASA, lo status SPF non indica un animale privo di microbi, bensì un animale esente da un elenco specifico di microrganismi patogeni e opportunisti (quali, ad esempio, il Murine Norovirus, il virus della coriomeningite linfocitaria, *Mycoplasma pulmonis* o gli ectoparassiti) in grado di causare patologie cliniche o subcliniche. Il mantenimento di questa classificazione richiede lo screening periodico delle colonie tramite metodiche sierologiche, biomolecolari (PCR) o, come dimostrato dalle evidenze più recenti in tema di Refinement, mediante l'analisi dei filtri HEPA delle gabbie IVC (*Exhaust Air Dust Testing*, EDT) (Williams et al., 2024). L'adozione di questa metodologia consente di superare completamente il ricorso ad animali vivi per il monitoraggio sanitario delle colonie, contribuendo all'applicazione concreta delle 3R.

All'estremo opposto della complessità microbiologica si collocano gli animali *Germ-free* (o assenici). Questi roditori sono completamente privi di qualsiasi forma di vita microbica associata (batteri, virus, funghi e parassiti) sia internamente che esternamente. Il loro allevamento avviene esclusivamente all'interno di isolatori flessibili sterili e richiede l'autoclavazione di ogni alimento e materiale, nonché procedure di nutrizione particolari, dato che l'assenza di microbiota intestinale altera profondamente lo sviluppo del sistema immunitario e l'anatomia cecale dell'animale. Partendo dai modelli assenici, è possibile generare gli animali Gnotobiotici (o a flora definita). In questi soggetti, l'ecosistema microbico intestinale non è assente, ma è composto esclusivamente da uno o più ceppi batterici noti e inoculati deliberatamente in laboratorio. I modelli gnotobiotici risultano ottimi strumenti per lo studio traslazionale del microbiota umano, delle malattie metaboliche e delle risposte immunologiche immunoterapiche nei modelli oncologici.

CAPITOLO 5 - Gestione biologica e zootecnica dei roditori sperimentali

5.1 Biologia e comportamento del topo

Il topo domestico (*Mus musculus*) è una specie fondamentalmente sociale, discendente da un antenato che in natura vive in colonie organizzate secondo gerarchie di dominanza (Domínguez-Oliva et al., 2025). La normativa internazionale, come la Direttiva UE 2010/63/EU e il *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, consiglia esplicitamente l'alloggio sociale per i topi ogni volta possibile (Domínguez-Oliva et al., 2025). Le femmine convivono generalmente in gruppi armoniosi, mentre i maschi rappresentano una sfida gestionale significativa a causa della loro spiccata aggressività inter-maschile. In condizioni naturali o semi-naturali, i maschi possono difendere un territorio da altri maschi, condividere un territorio con pochi altri individui organizzati in rapporti dominante-subordinato, o vivere in isolamento in zone intermedie tra i territori difesi. Le condizioni di allevamento in laboratorio possono peggiorare l'aggressività: gli animali sono ospitati in gabbie di piccole dimensioni, spesso hanno età diverse e compagni di gabbia non familiari, sono sottoposti a procedure sperimentali e a frequenti interruzioni dei segnali odorosi dovute ai cambi di gabbia.

L'aggressività e la sua gestione sono aspetti centrali per la gestione dei topi. Una ricerca condotta su topi CD-1/ICR ha valutato l'effetto della dimensione del gruppo, dell'età al momento del raggruppamento e della frequenza di manipolazione sull'aggressività inter-maschile. I risultati hanno mostrato che i topi alloggiati in gruppi di tre presentavano significativamente meno ferite da morso rispetto a quelli in coppia. Contrariamente alle aspettative, i topi manipolati minimamente (una volta a settimana) mostravano più ferite di quelli manipolati quotidianamente (Williams et al., 2024). L'uso di materiale per il nido, e in particolare il trasferimento di questo materiale durante i cambi di gabbia o l'uso di strutture simili a tane che dividono la gabbia, si è dimostrato efficace nel ridurre l'aggressività (Domínguez-Oliva et al., 2025).

Per quanto riguarda lo stress, nei roditori può essere valutato attraverso diversi parametri fisiologici. L'indicatore più comunemente usato è il corticosterone; infatti, i suoi livelli aumentano in risposta a qualsiasi stress ambientale (Domínguez-Oliva et al., 2025). In condizioni standard di allevamento, il corticosterone mostra un tipico andamento circadiano con picchi diurni intorno

alle 16:00. L'arricchimento ambientale si è dimostrato efficace nel ridurre le concentrazioni di corticosterone, indicando livelli di stress più bassi. Inoltre, la sua presenza migliora parametri come tachicardia, ipertensione e variabilità della frequenza cardiaca, riflettendo effetti benefici sul sistema cardiovascolare (Domínguez-Oliva et al., 2025). Correlato all'arricchimento ambientale troviamo il *nest building*, ovvero un comportamento essenziale per i topi, finalizzato alla termoregolazione e al benessere psicofisico (Domínguez-Oliva et al., 2025). La fornitura di materiale per il nido è considerata un arricchimento essenziale e non facoltativo, in quanto incide direttamente sulla capacità dell'animale di mantenere l'omeostasi termica e ridurre lo stress.

5.2 Biologia e comportamento del ratto

Il ratto (*Rattus norvegicus*) è una specie altamente sociale e con notevoli capacità cognitive. Come il topo, il ratto beneficia dell'alloggio sociale, che favorisce comportamenti naturali e riduce lo stress. La comunicazione chimica attraverso i feromoni è particolarmente importante per i ratti, che utilizzano segnali odorosi per la comunicazione sociale, la marcatura del territorio e il riconoscimento individuale (Domínguez-Oliva et al., 2025).

La manipolazione rappresenta un fattore critico per il benessere e la qualità dei dati sperimentali nei ratti. La frequenza di pulizia delle gabbie, che interrompe i segnali odorosi, può influenzare la *handleability* (la facilità con cui gli animali possono essere manipolati). Uno studio ha evidenziato che una pulizia frequente (due volte a settimana) diminuisce l'ammoniaca ma riduce la *handleability* dei ratti (Burn et al., 2006).

La scelta della lettiera ha un impatto significativo sulla salute dei ratti. Lo stesso studio menzionato precedentemente (Burn et al., 2006) ha rilevato che i ratti mantenuti su lettiera di pioppo (aspen) presentavano maggiori tassi di starnuti e patologie polmonari rispetto a quelli su lettiera di carta, nonostante il pioppo sia considerato relativamente inerte rispetto ad altre lettiere di legno. Sorprendentemente, la lettiera di pioppo era associata a un maggior peso corporeo, suggerendo complesse interazioni tra ambiente, fisiologia e metabolismo.

Volendo fare un confronto fra le due specie in esame, esistono delle differenze dal punto di vista biologico (Tabella 2) e comportamentale. Il ratto si distingue dal topo per maggiori dimensioni e

forza, che richiedono tecniche di contenimento specifiche, capacità cognitive superiori, maggiore complessità comportamentale e risposta all'arricchimento ambientale. Inoltre, presenta una maggiore suscettibilità a patologie respiratorie, influenzata dalla scelta della lettiera e dalla ventilazione (Burn et al., 2006), e una diversa organizzazione sociale, con gerarchie generalmente meno rigide rispetto ai topi maschi.

	<i>Topo (Mus musculus)</i>	<i>Ratto (Rattus norvegicus)</i>
<i>Durata di vita</i>	1 – 4 anni	1 – 4 anni
<i>Raggiungimento maturità sessuale</i>	30 – 50 giorni	Circa 70 giorni
<i>Durata della gravidanza</i>	19 – 21 giorni	21 – 24 giorni
<i>N° medio di prole per parto</i>	6 - 12	7 – 11
<i>Peso alla nascita</i>	1 – 1,5 grammi	5 – 6 grammi
<i>Peso adulto</i>	25 – 40 grammi	300 – 600 grammi
<i>Temperatura corporea</i>	35,9 – 37,6 °C	37,5 – 38,5 °C
<i>Frequenza cardiaca (bpm)</i>	329 – 780	300 – 504
<i>Atti respiratori (al minuto)</i>	84 – 230	85 – 113
<i>Consumo di acqua (al giorno)</i>	4 – 7 ml	20 – 45 ml

Tabella 2: caratteristiche biologiche di topo (*Mus musculus*) e ratto (*Rattus norvegicus*)

5.3 Cavia e criceto

La cavia (*Cavia porcellus*) presenta una caratteristica nutrizionale unica: l'incapacità di sintetizzare la vitamina C (acido ascorbico) in quantità sufficiente a soddisfare il fabbisogno giornaliero (Nature, 1973). Una carenza di vitamina C porta a debilitazione, aumento della suscettibilità alle malattie e, infine, allo scorbuto. La vitamina C può essere somministrata nel mangime pellettato (800 mg/kg di dieta finita), nell'acqua potabile (1 g/litro), somministrata fresca ogni giorno, o attraverso verdure fresche, che devono essere accuratamente lavate prima della somministrazione (Agriculture Victoria, 2020). La cavia ha inoltre un elevato fabbisogno di fibra (16%), che viene soddisfatto al meglio con fieno di erba medica di buona qualità. La dieta deve contenere almeno il 20% di proteine (Agriculture Victoria, 2020). Quanto al comportamento sociale, le cavia sono animali sociali che traggono beneficio dalla compagnia di conspecifici. L'alloggio sociale è quindi raccomandato, prestando attenzione alla compatibilità tra i soggetti.

Il criceto siriano (*Mesocricetus auratus*), invece, è un animale solitario e naturalmente territoriale; in questo caso le femmine sono più aggressive dei maschi (Elidio et al., 2021). Questa caratteristica rende difficile la gestione, poiché vengono solitamente alloggiati in gruppi, il che può scatenare comportamenti aggressivi. Uno studio di refinement ha valutato diverse strategie per ridurre l'aggressività nel criceto siriano, concludendo che i maschi alloggiati in gruppi di 4 e le femmine alloggiate singolarmente riducono il rischio di incidenti durante la manipolazione, evitando stress e conseguenti alterazioni fisiologiche che potrebbero compromettere l'affidabilità dei risultati sperimentali (Elidio et al., 2021).

5.4 Alimentazione

Tutte e quattro le specie di roditori da laboratorio praticano la coprofagia, ovvero il comportamento attraverso cui un animale ingerisce le proprie feci o quelle di un altro individuo (Hirakawa, 2001; Soave & Campbell, 1991). Nei roditori e nei lagomorfi, questa pratica rappresenta un meccanismo fisiologico essenziale per il recupero di nutrienti. In particolare, viene riconosciuta la cecotrofia, ovvero l'ingestione di feci morbide prodotte durante specifici periodi della giornata e ricche di vitamine del gruppo B, vitamina K e proteine microbiche derivate dalla fermentazione batterica nel cieco (Hirakawa, 2001; Li et al., 2020). Sono inoltre animali cauti nell'alimentazione, che tendono a evitare cibi non familiari, soprattutto le cavie (Agriculture Victoria, 2020). Le linee guida per la nutrizione dei roditori da laboratorio richiedono una dieta palatabile, priva di contaminanti e che fornisca i requisiti nutrizionali appropriati per specie, età e stadio riproduttivo (Agriculture Victoria, 2020). Lo stoccaggio del cibo in ambienti freschi e a prova di roditori è essenziale per prevenire rischi per la salute degli animali, ed è richiesta una costante comunicazione tra ricercatori e personale dello stabulario riguardo qualsiasi integrazione o manipolazione delle diete.

Come già menzionato, i mangimi per roditori SPF e per germ-free devono essere sterilizzati per eliminare potenziali patogeni. Le due principali tecniche sono l'autoclave e l'irradiazione. Uno studio classico di Ford (1976) ha confrontato l'effetto di diversi metodi di sterilizzazione sul valore nutritivo delle proteine in una dieta commerciale per ratti. L'autoclave a 121°C per 60 minuti riduce significativamente il valore biologico (BV), la digeribilità (TD) e l'utilizzazione proteica netta

(NPU). L'autoclave a 134°C per 3 minuti causa danni minori. La disponibilità degli amminoacidi diminuisce con l'aumentare di tempo e temperatura di trattamento (Ford, 1976). L'irradiazione con 2,5 o 10 Mrd non ha effetti su BV, TD, NPU o amminoacidi totali, con una lieve riduzione solo per la lisina. La conclusione pratica è che l'irradiazione causa il minor danno alle proteine nelle diete per roditori; se le diete devono essere autoclavate, dovrebbero essere integrate con proteine complete per contrastare la distruzione degli amminoacidi (Ford, 1976).

Relativamente all'acqua fornita ai roditori, deve essere di alta qualità, potabile e priva di contaminanti chimici e microbiologici. L'acidificazione (a pH 2.5-3.0) è una pratica comune per inibire la crescita batterica, in particolare di *Pseudomonas aeruginosa*, ma può influenzare la palatabilità e la salute dentale. La filtrazione (a 0.2 µm) e la sterilizzazione (autoclave o irradiazione UV) sono metodi efficaci per garantire la purezza microbiologica dell'acqua, essenziale per mantenere lo stato SPF delle colonie. Infatti, negli stabulari per roditori SPF, il controllo periodico della qualità dell'acqua di abbeveraggio rappresenta una pratica essenziale del programma di monitoraggio sanitario, come raccomandato dalle linee guida FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations).

5.5 Lettiera e materiale da nido

La scelta della lettiera ha implicazioni significative sulla salute, sul benessere e sulla qualità dei dati sperimentali (Burn et al., 2006; Ferrecchia et al., 2014). Le principali tipologie includono corncob (pannocchia di mais), pasta di legno, aspen (trucioli di pioppo), carta riciclata e lettiera di carta (Ferrecchia et al., 2014).

Una delle criticità relative alla scelta della lettiera sono i livelli di ammoniaca all'interno della gabbia, i quali rappresentano un parametro critico per il benessere respiratorio dei roditori (Ferrecchia et al., 2014). Uno studio ha confrontato quattro substrati di lettiera per topi C57BL/6 in gabbie statiche e IVC (Ferrecchia et al., 2014). È emerso che la pasta di legno non controlla adeguatamente i livelli di ammoniaca, causando alterazioni patologiche nelle narici dei topi entro una settimana in gabbie statiche. Invece, corncob irradiato, aspen e carta riciclata si sono dimostrati adeguati a cambi settimanali in gabbie statiche e bisettimanali in IVC (Ferrecchia et al., 2014).

La lettiera, infine, può interagire con i risultati sperimentali in diversi modi. In studi tossicologici, alcune lettiere possono rilasciare composti volatili o adsorbire sostanze chimiche, alterando l'esposizione. In studi metabolici, la lettiera di carta può influenzare la salute polmonare in modo diverso rispetto al legno, come dimostrato dall'aumento di starnuti e patologie polmonari nei ratti su aspen (Burn et al., 2006). In studi comportamentali, la lettiera influenza il nesting, l'esplorazione e altri comportamenti specie-specifici.

5.6 Riproduzione e gestione delle colonie

La gestione delle colonie riproduttive richiede strategie di accoppiamento appropriate: monogamico (una coppia in una gabbia), poligamico (un maschio con più femmine) o harem (un maschio con un gruppo di femmine, tipicamente utilizzato per linee geneticamente modificate). La scelta della strategia dipende dalla linea genetica, dagli obiettivi di produzione e dalle risorse disponibili. Lo svezzamento avviene tipicamente a 21 giorni di età e rappresenta un momento critico. È importante separare i maschi dalle femmine per prevenire gravidanze indesiderate e ridurre l'aggressività.

L'identificazione individuale costituisce un elemento fondamentale durante tutta la vita dell'animale. È essenziale per garantire il successo della ricerca in vivo, consentendo di tracciare ogni animale durante l'esperimento e facilitando l'analisi dei risultati nel rispetto dei protocolli etici (Moula et al., 2025). I metodi comunemente utilizzati includono *ear tag* (marcatura auricolare), microchip, tatuaggio, *ear punching* (perforazione auricolare) e taglio delle dita (*toe clipping*).

Un altro aspetto critico dal punto di vista gestionale sono le linee transgeniche, le quali richiedono competenze specifiche per mantenere l'integrità genetica, prevenire la deriva genetica e garantire la riproducibilità dei modelli (The Francis Crick Institute, 2024). È essenziale un'attenta pianificazione degli accoppiamenti per preservare il genotipo desiderato e prevenire la sovrapproduzione.

La sovrapproduzione di animali è un problema sia a livello etico che economico. Le strategie per prevenirla includono una pianificazione accurata degli accoppiamenti basata sulle esigenze sperimentali, l'uso di strategie di breeding ottimizzate, la crioconservazione e la condivisione di linee tra laboratori (The Francis Crick Institute, 2024). La crioconservazione di embrioni, spermatozoi o ovociti rappresenta una strategia efficace per ridurre il numero di animali vivi mantenuti in colonia, prevenire la deriva genetica, preservare linee genetiche a bassa richiesta e favorire la riduzione della sovrapproduzione, in linea con il principio di riduzione delle 3R (The Francis Crick Institute, 2024).

5.7 Identificazione degli animali

L'identificazione individuale è un prerequisito per la tracciabilità e la qualità dei dati. I metodi comunemente utilizzati includono:

- a) *Ear tag* (marcatura auricolare): piccolo tag metallico applicato all'orecchio, offre identificazione permanente a basso costo ma può causare infiammazione, dolore e reazioni fibrotiche se non applicato correttamente.
- b) Microchip: chip elettronico impiantato sottocute, offre identificazione univoca e leggibilità elettronica ma richiede un dispositivo di lettura e ha un costo maggiore.
- c) *Tattoo*: tatuaggio su coda o plantare, è permanente e minimamente invasivo ma può sbiadire nel tempo.
- d) *Ear punching* (perforazione auricolare): foro nell'orecchio per campione di tessuto, permette identificazione e genotipizzazione simultanea ma è invasivo e richiede registrazione (Moula et al., 2025).
- e) Taglio delle dita (*toe clipping*): amputazione di una falange, utilizzato in giovani individui; quest'ultimo è considerato invasivo e da evitare quando possibile (Moula et al., 2025).

Esiste un metodo integrato che combina *ear punch* per la genotipizzazione e applicazione del tag di identificazione nella stessa perforazione; questo riduce lo stress, previene l'infiammazione e ottimizza la genotipizzazione, garantendo la conformità normativa (Moula et al., 2025). Relativamente alla genotipizzazione dei topi geneticamente modificati, è una pratica di routine per verificare il background genetico delle linee attraverso amplificazione PCR (Moula et al., 2025;

The Francis Crick Institute, 2024). I metodi di prelievo includono, appunto, *ear punching*, biopsia di coda (classificata come invasiva dalla normativa UE), campione di pelo e tampone orale/rettale.

La scelta del metodo di identificazione deve bilanciare l'esigenza di identificazione univoca e permanente con il minimo impatto sul benessere. Il metodo integrato che combina *ear punch* e applicazione del tag di identificazione è una soluzione ideale in quanto riduce lo stress e le manipolazioni ripetute, ottimizza la genotipizzazione e garantisce la conformità normativa (Moula et al., 2025).

L'accuratezza e la tracciabilità sono fondamentali per la gestione delle colonie e la validità dei dati sperimentali. I metodi di identificazione devono garantire l'unicità e la permanenza del codice identificativo per tutto il ciclo di vita dell'animale, consentendo di risalire alla sua storia clinica, genetica e sperimentale.

5.8 Trasporto e movimentazione

Il trasporto all'interno dello stabulario è una causa significativa di stress per i roditori, con potenziali impatti sulla fisiologia e sul comportamento. Uno studio recente (Williams et al., 2024) ha valutato l'impatto del trasporto interno in carrello sui topi, confrontando un carrello metallico standard con un carrello pneumatico progettato per attenuare rumore e vibrazioni. Il carrello metallico ha generato livelli elevati di rumore e vibrazioni, causando un aumento del corticosterone plasmatico, con picchi circadiani rimasti elevati per 48 ore, indicando potenziali effetti cronici. Il carrello pneumatico ha mantenuto i livelli di corticosterone entro i range del controllo. Le misure comportamentali non hanno mostrato differenze significative, suggerendo che lo stress non ha superato la soglia per indurre cambiamenti comportamentali. Il trasporto è una fonte di stress che, oltre all'impatto sul benessere animale, può compromettere anche la qualità dei dati sperimentali. Studi come quello citato precedentemente (Williams et al., 2024) dimostrano che metodi di trasporto adeguati possono ridurre il periodo di acclimatazione necessario. Un periodo di acclimatazione di almeno 1 ora dopo il trasporto sembra sufficiente per normalizzare i livelli di corticosterone, ma la risposta allo stress può variare in base a ceppo, sesso ed età degli animali.

Il trasferimento tra stabilimenti, invece, richiede procedure ancora più rigorose, includendo quarantena, periodi di acclimatazione più lunghi (generalmente almeno 7-14 giorni) per permettere agli animali di adattarsi al nuovo ambiente, dieta e personale, e monitoraggio sanitario e comportamentale durante e dopo il trasporto. È essenziale documentare lo stato sanitario e genetico degli animali per prevenire l'introduzione di patogeni e garantire la continuità sperimentale.

CAPITOLO 6 - Benessere animale negli allevamenti sperimentali di roditori

6.1 Concetto di benessere negli animali da laboratorio

Il concetto di benessere animale in ambito sperimentale rappresenta un paradigma complesso e multidimensionale che va ben oltre la mera assenza di patologie o sofferenze fisiche. Secondo la definizione ampiamente accettata del Consiglio per il Benessere Animale (*Farm Animal Welfare Council*, FAWC), il benessere di un animale è determinato dalla sua capacità di adattarsi all'ambiente in cui vive, un concetto sintetizzato nelle cosiddette "Cinque Libertà" (FAWC, 1992). Queste libertà, sebbene concepite per gli animali da reddito, costituiscono un quadro di riferimento fondamentale anche per la ricerca in vivo, adattandosi al contesto specifico degli animali da laboratorio. Esse comprendono la libertà dalla fame e dalla sete, dal disagio, dal dolore, dalla malattia e dalla paura, nonché la libertà di esprimere comportamenti naturali. Nel contesto della ricerca, il benessere di un roditore da laboratorio è quindi definito da uno stato di equilibrio fisico, psicologico e comportamentale dell'animale in relazione al suo ambiente di vita e alle procedure sperimentali a cui è sottoposto (Baumans, 2005).

Il benessere fisico si riferisce alla salute somatica dell'animale, alla sua integrità fisiologica e all'assenza di lesioni o patologie. Il benessere psicologico, invece, è un costrutto più sfumato che riguarda lo stato emotivo dell'animale, includendo l'assenza di stati negativi come ansia, paura e frustrazione, e la presenza di stati positivi come il piacere e la sensazione di controllo sull'ambiente (Mellor, 2016). Il benessere comportamentale, infine, è legato alla possibilità per l'animale di esprimere il proprio repertorio etologico, svolgendo attività specie-specifiche come l'esplorazione, la costruzione del nido, la socialità e l'attività locomotoria. La privazione di tali opportunità può condurre a uno stato di malessere cronico e allo sviluppo di anomalie comportamentali.

Per valutare questo stato complesso, è necessario utilizzare una serie di indicatori che possono essere suddivisi in positivi e negativi. Gli indicatori negativi sono i più comunemente utilizzati e includono la perdita di peso, la riduzione dell'attività, la piloerezione, le alterazioni del mantello e del comportamento, e le stereotipie. Questi segni sono spesso il riflesso di uno stato di stress cronico, dolore o malattia (Morton et al., 1985). Tuttavia, la valutazione del benessere non può

limitarsi all'assenza di questi segni. Un crescente numero di studi sottolinea l'importanza di identificare e misurare indicatori positivi, come l'attività esplorativa, la qualità del sonno, le interazioni sociali positive e la presenza di comportamenti appetitivi, che testimoniano uno stato di benessere autentico e non solo l'assenza di sofferenza (Spruijt et al., 2001). Un animale che mostra un repertorio comportamentale vario e che interagisce attivamente con l'ambiente arricchito è un indicatore di un elevato livello di benessere.

La rilevanza del benessere animale nella ricerca in vivo non è solo di natura etica, ma è intrinsecamente legata alla qualità e alla riproducibilità dei dati scientifici ottenuti (Poole, 1997; Balcombe et al., 2004). Lo stress cronico, la paura e il dolore attivano il sistema neuroendocrino, in particolare l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), con conseguente rilascio di glucocorticoidi. Questi ormoni possono influenzare profondamente una moltitudine di parametri fisiologici e comportamentali, inclusi il sistema immunitario, il metabolismo, il sistema cardiovascolare e persino l'espressione genica (McEwen, 2007). Di conseguenza, un animale che vive in uno stato di malessere cronico può produrre dati che sono il riflesso di questa condizione patologica, piuttosto che dell'effetto specifico del trattamento sperimentale. Ciò introduce una fonte di variabilità non sperimentale che può mascherare effetti reali o, al contrario, generare falsi positivi, minando l'affidabilità e la validità della ricerca. L'implementazione di strategie per migliorare il benessere, come l'arricchimento ambientale e l'handling non avversivo, non solo è un obbligo etico, ma si configura come un requisito metodologico per una buona pratica scientifica, contribuendo a ridurre la variabilità biologica e a migliorare la robustezza dei risultati sperimentali (Würbel, 2001; Bayne & Würbel, 2014).

6.2 Indicatori di stress e sofferenza

La valutazione del benessere degli animali da laboratorio si basa sull'identificazione accurata di indicatori di stress e sofferenza. Questi indicatori, che possono essere di natura clinica, fisiologica e comportamentale, rappresentano lo strumento principale per il personale di stabulario e i ricercatori per monitorare lo stato di salute dell'animale e l'impatto delle procedure sperimentali. La loro corretta identificazione, che richiede competenza e formazione specifica, è fondamentale per l'applicazione tempestiva di misure correttive o per la decisione di intervenire con un endpoint umano. Di seguito si analizzano i principali indicatori di sofferenza nei roditori.

La perdita di peso è uno degli indicatori clinici più oggettivi e facilmente misurabili. Una riduzione ponderale superiore al 15-20% rispetto al peso iniziale o di un controllo sano è spesso considerata un campanello d'allarme significativo. La perdita di peso può essere il risultato di una ridotta assunzione di cibo e acqua, di un aumento del dispendio energetico dovuto a ipertermia o iperattività, o di un alterato metabolismo a causa di patologie sistemiche (Morton et al., 1993). Il monitoraggio regolare del peso è quindi una pratica essenziale.

La presenza di pelo arruffato e opaco è un segno visibile di malessere generale. La piloerezione riduce la dispersione termica ed è spesso associata a febbre, stress o dolore cronico. Un mantello normale, liscio e lucido, è invece un indicatore di buona salute e benessere. Di fatto, anche le alterazioni del grooming costituiscono un segnale fondamentale. Il comportamento di toelettatura (grooming) è un'attività importante per la termoregolazione, la cura del mantello e la comunicazione sociale. In condizioni di stress o malessere, questo comportamento può essere alterato. Si può osservare una riduzione del grooming, che porta a un mantello sporco e trasandato, oppure, al contrario, un aumento del grooming in aree specifiche (iperalgisia) o la comparsa di un grooming stereotipato ed eccessivo che può portare a lesioni cutanee (alopecia, dermatiti).

Inoltre, anche una postura anomala può indicare uno stato di mancato benessere. L'animale che soffre può assumere posture caratteristiche per alleviare il dolore o il disagio. Esempi tipici includono la postura "incassata" (con la schiena arcuata e l'addome retratto), il capo chino, o una posizione di "torpore" in un angolo della gabbia. Può inoltre essere osservata una stazione eretta con gli arti divaricati, che suggerisce un dolore addominale (Langford et al., 2010).

Successivamente, anche un decremento dell'attività locomotoria spontanea e del comportamento esplorativo è spesso indicativo di malattia o dolore. L'animale appare letargico, meno reattivo agli stimoli e la sua propensione a interagire con l'ambiente e i conspecifici diminuisce drasticamente. Tuttavia, è importante notare che, in alcuni casi di dolore acuto, può verificarsi un effetto opposto, con un aumento dell'attività in risposta a uno stimolo doloroso (Mogil, 2009).

Le vocalizzazioni ultrasoniche (USV) possono, anch'esse, dare indicazioni sullo stato di benessere dei roditori. I topi e i ratti comunicano prevalentemente attraverso vocalizzazioni ultrasoniche che non sono udibili dall'orecchio umano. Questi suoni possono essere suddivisi in due categorie principali, associate a valenze emotive opposte. Le USV a frequenza più bassa (circa 22 kHz nei ratti) sono tipicamente associate a stati negativi, come paura, sottomissione o dolore. Al contrario, le USV a frequenza più alta (circa 50 kHz nei ratti) sono correlate a stati positivi, come il piacere e l'appetito. Il monitoraggio delle USV richiede attrezzature specifiche, ma rappresenta un potente strumento non invasivo per valutare lo stato emotivo degli animali (Portfors, 2007).

In aggiunta, anche un aumento dell'aggressività verso i conspecifici o l'operatore può rappresentare un sintomo di stress, paura o dolore. Un animale che soffre può mostrare una soglia di irritabilità più bassa e reagire in modo aggressivo a stimoli altrimenti innocui, come la manipolazione. L'aggressività può essere un importante campanello d'allarme di un ambiente avverso o di una procedura dolorosa, ma la sua interpretazione è complessa, poiché può essere influenzata da fattori genetici, sociali e ambientali.

Di uguale importanza sono le precedentemente citate stereotipie, ovvero movimenti o comportamenti ripetitivi, invariati e apparentemente senza funzione, che si manifestano in condizioni di stress cronico o in ambienti fortemente deprivati (Garner et al., 2006). Esempi comuni nei roditori includono il comportamento di "dondolamento", il *barbering* (toelettatura del pelo dei compagni di gabbia), il saltare ripetutamente, il girare in tondo, il mordere le sbarre della gabbia, o l'*iperdigging* (scavare in modo eccessivo). Le stereotipie sono considerate un tentativo di adattamento ad una situazione di malessere non risolvibile.

Oltre ai segni clinici visibili, la sofferenza si manifesta anche attraverso alterazioni fisiologiche misurabili, come il consumo di cibo e acqua, la produzione di urine e feci (che possono essere alterate in caso di diarrea), e le variazioni della temperatura corporea. Parametri fisiologici quali la frequenza cardiaca e respiratoria, e i livelli di glucocorticoidi (corticosterone nei roditori) nel sangue, nella saliva o nelle feci, forniscono una misura più oggettiva dello stress, sebbene la loro rilevazione richieda procedure che possono a loro volta essere stressanti (Gaskill et al., 2013). L'integrazione di osservazioni comportamentali, con misurazioni fisiologiche offre un quadro più completo e affidabile dello stato di benessere dell'animale. Dal punto di vista comportamentale,

l'utilizzo della *Mouse Grimace Scale* (NC3Rs) rappresenta uno strumento fondamentale per la valutazione del benessere animale. Si basa sull'analisi di specifici cambiamenti nell'espressione facciale del topo (Immagine 2). Come descritto dal *National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research* (NC3Rs), questa scala si concentra su tratti dell'espressione facciale, ad esempio la chiusura della palpebra (*orbital tightening*), che aumentano di intensità in risposta al dolore post-procedurale. Il suo scopo è fornire ai ricercatori e al personale di stabulario un metodo pratico e non invasivo per il riconoscimento precoce del dolore negli animali svegli, da integrare nella valutazione clinica quotidiana per migliorare il benessere animale e affinare le pratiche sperimentali.

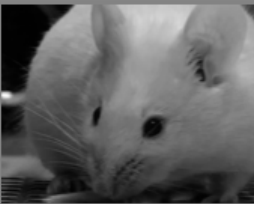
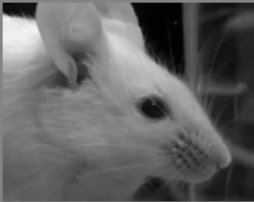
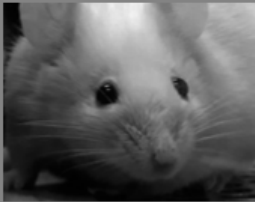
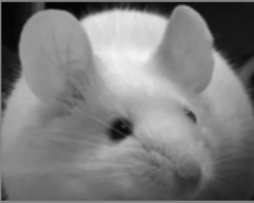
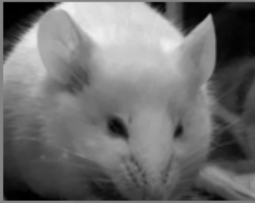
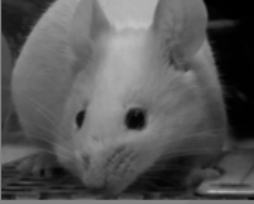
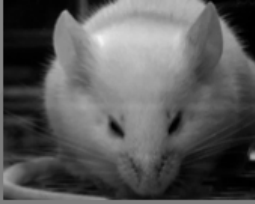
	Not present "0"	Moderately present "1"	Obviously present "2"
Orbital tightening ▪ Closing of the eyelid (narrowing of orbital area) ▪ A wrinkle may be visible around the eye			
Nose bulge ▪ Bulging on the bridge of the nose ▪ Vertical wrinkles on the side of the nose			
Cheek bulge ▪ Bulging of the cheeks			
Ear position ▪ Ears rotate outwards and/or backwards, away from the face ▪ Ears may fold to form a 'pointed' shape ▪ Space between the ears increases			
Whisker change ▪ Whiskers are either pulled back against the cheek, or pulled forward to 'stand on end' ▪ Whiskers may clump together ▪ Whiskers lose their natural 'downward' curve			

Immagine 2: *Mouse Grimace Scale*. Presa e modificata da *National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research*.

La valutazione deve essere sempre contestualizzata, considerando i valori di base della specie, il ceppo, l'età e il sesso, nonché le condizioni specifiche dell'esperimento. L'osservazione regolare e sistematica da parte di personale esperto è la chiave per un precoce riconoscimento del disagio e per un intervento tempestivo.

6.3 Arricchimento ambientale

L'arricchimento ambientale è definito come qualsiasi modifica dell'ambiente di stabulazione che miri a migliorare il benessere fisico e psicologico degli animali, fornendo loro stimoli che soddisfino i bisogni etologici e comportamentali (Baumans, 2005). Per i roditori, animali estremamente intelligenti e attivi, un ambiente di vita povero di stimoli può portare a noia, frustrazione e stress cronico, compromettendo il loro benessere e, di conseguenza, la validità della ricerca (Würbel, 2001). L'implementazione di un programma di arricchimento efficace è quindi una componente essenziale della gestione di un allevamento sperimentale. Gli elementi di arricchimento possono essere di varia natura e devono essere progettati per essere efficaci, sicuri e compatibili con il disegno sperimentale.

Il materiale per la nidificazione (*nesting material*) è forse l'elemento di arricchimento più importante per i roditori. Topi e ratti hanno un forte istinto di costruzione di nidi per termoregolarsi e per sentirsi al sicuro. La fornitura di materiali come carta velina, trucioli di legno, strisce di cartone o tessuto non tessuto (come il noto "Nestlet") permette loro di esprimere questo comportamento naturale. Gli studi hanno dimostrato che il *nesting material* riduce lo stress e l'ansia, migliora la termoregolazione e promuove un sonno più riposante, portando a un miglioramento complessivo del benessere (Gaskill et al., 2013; Van de Weerd et al., 2004).

In aggiunta, i rifugi (*shelters*), come cassette di plastica o cartone, tubi o strutture a cupola, forniscono agli animali un luogo sicuro dove ritirarsi per riposare o per sfuggire a stimoli stressanti. La possibilità di nascondersi è fondamentale per ridurre l'ansia, specialmente per le specie preda come i roditori. La presenza di un rifugio è stata associata a una riduzione dei livelli di glucocorticoidi e a un aumento del comportamento esplorativo (Patterson-Kane, 2001). È importante che i rifugi siano di dimensioni adeguate, facilmente pulibili e non interferiscano con le osservazioni sperimentali. Ad esempio, i tubi, spesso in PVC o plastica, fungono sia da rifugi che

da percorsi per l'esplorazione. Incoraggiano l'attività fisica e il comportamento esplorativo, oltre a fornire un senso di sicurezza. Nei sistemi di gabbie a più piani o in quelli con collegamenti, i tubi possono anche aumentare lo spazio utilizzabile e la complessità ambientale.

Di uguale importanza è la presenza di oggetti da rosicchiare. I roditori hanno incisivi a crescita continua che necessitano di essere consumati per evitare problemi di malocclusione. La fornitura di oggetti da rosicchiare, come blocchi di legno, ossa di seppia, o bastoncini di mais, soddisfa questo bisogno fisiologico e comportamentale, contribuendo a ridurre lo stress e a prevenire comportamenti anomali come la morsicatura delle sbarre della gabbia.

Il topo e il ratto, inoltre, sono animali altamente sociali che vivono in colonie strutturate. L'isolamento sociale è considerata una fonte di stress per queste specie e dovrebbe essere evitato quando possibile. L'allevamento in gruppi stabili permette l'espressione di comportamenti sociali come il grooming reciproco, il gioco e la comunicazione, tutti fattori che contribuiscono a un buon benessere psicologico (Hurst et al., 1999). Tuttavia, è fondamentale monitorare attentamente le dinamiche sociali per prevenire episodi di aggressività, che possono invece essere fonte di sofferenza.

Una delle principali sfide nell'implementazione dell'arricchimento ambientale è la sua potenziale interferenza con i protocolli sperimentali. Ad esempio, alcuni tipi di arricchimento possono rendere più difficile l'osservazione degli animali, il prelievo di campioni biologici (come le feci per l'analisi dei glucocorticoidi), o le procedure di somministrazione di farmaci. Inoltre, alcuni oggetti potrebbero non essere compatibili con specifici modelli di malattia o con gli endpoint umani. È quindi compito del ricercatore e del personale di stabulario valutare caso per caso il miglior equilibrio tra il beneficio per il benessere animale e la necessità di preservare l'integrità dello studio (Bayne, 2005). Nello studio di Bayne (2005) viene sottolineato, infatti, come gli effetti dell'arricchimento ambientale vadano considerati nel contesto specifico della salute dell'animale e degli obiettivi sperimentali. In molti casi, una pianificazione attenta e la scelta di arricchimenti appropriati possono minimizzare queste interferenze.

Un'altra critica spesso mossa all'arricchimento ambientale è che possa introdurre una fonte di variabilità nei dati sperimentali. Va riconosciuto che diversi tipi di arricchimento o la loro

disposizione possono influenzare i livelli di attività, il metabolismo e persino i parametri ematologici, modificando la risposta dell'organismo a un trattamento. Tuttavia, numerosi studi dimostrano che, se standardizzato e applicato in modo uniforme a tutti i gruppi sperimentali, l'arricchimento riduce la variabilità interindividuale piuttosto che aumentarla, rendendo i dati più robusti e riproducibili (Würbel, 2002; Bayne, 2005). Un animale con un buon benessere è un animale più stabile, il cui fenotipo è meno influenzato da uno stress di fondo aspecifico.

In sintesi, l'arricchimento ambientale non è un fattore secondario, ma un elemento fondamentale per una gestione etica e scientificamente valida della sperimentazione animale. La sua progettazione deve essere flessibile e basata sulle evidenze, adattata alle esigenze della specie e del singolo studio, ma la sua implementazione rappresenta un passo cruciale verso l'applicazione del principio del Refinement.

6.4 Handling e interazione uomo-animale

Le procedure di manipolazione (*handling*) degli animali rappresentano uno degli eventi più frequenti e potenzialmente stressanti nella vita di un roditore da laboratorio. La percezione dell'uomo come predatore, combinata con metodi di presa inappropriati, può scatenare una forte risposta di paura e ansia, con conseguente attivazione dell'asse HPA e rilascio di glucocorticoidi (Balcombe et al., 2004). Questo stress da manipolazione non solo compromette il benessere animale, ma può alterare in modo significativo i risultati sperimentali, influenzando parametri come il comportamento, i livelli ormonali e la risposta immunitaria (Hurst & West, 2010). Per questo motivo, la definizione di protocolli di *handling* a basso stress (o *non-aversive*) e la formazione del personale sono aspetti centrali del Refinement. Negli ultimi anni, si è assistito a un cambiamento di paradigma, con il superamento delle tecniche tradizionali a favore di metodi più rispettosi.

I metodi tradizionali di manipolazione dei roditori prevedono spesso la presa per la coda, seguita dal sollevamento dell'animale per la pelle del collo (*scruffing*). Queste tecniche, sebbene ancora diffuse, sono state ampiamente criticate per essere fortemente stressanti. La presa per la coda, in particolare, provoca un disagio significativo e può indurre comportamenti di paura e ansia (Hurst et al., 2010). Lo *scruffing* è una tecnica che, sebbene utile per alcune procedure (come

l'iniezione intraperitoneale), rimane opprimente e può limitare l'animale nella sua capacità di esprimere comportamenti di fuga. Numerosi studi hanno dimostrato che la manipolazione tradizionale aumenta i livelli di corticosterone e altera il comportamento nei test come l'*open field* o l'*elevated plus maze* (Vallée et al., 1997; Ueno et al., 2020).

Negli ultimi anni, la tecnica del *tunnel handling* ha guadagnato ampia popolarità, grazie agli studi pionieristici di Hurst et al. (2010). Questa tecnica consiste nell'utilizzare un tunnel di plastica (come quelli usati per i topi) per catturare l'animale direttamente dalla sua gabbia. Il tunnel viene appoggiato all'ingresso della gabbia e l'animale, spinto dalla curiosità, vi entra volontariamente. Una volta all'interno del tunnel, l'animale può essere trasferito in modo sicuro e senza contatto diretto. Questa tecnica è considerata una procedura a basso stress perché rispetta l'etologia dell'animale, dandogli la sensazione di controllo e un rifugio sicuro. La ricerca ha dimostrato che gli animali manipolati con il *tunnel handling* mostrano livelli di ansia significativamente inferiori, minori segni di paura verso l'operatore e una maggiore propensione a collaborare, con una conseguente riduzione della variabilità sperimentale.

Un'altra tecnica rispettosa del benessere è il *cupping* (o manipolazione a mano aperta). In questa tecnica, l'animale viene raccolto e sostenuto sul palmo della mano aperta, permettendogli di muoversi e di avere un punto di appoggio. Sebbene richieda più tempo e destrezza da parte dell'operatore, specialmente se l'animale non è abituato, è considerata molto meno stressante della presa per la coda. La mano dell'operatore viene percepita come una superficie solida e sicura piuttosto che come una minaccia. Studi comparativi hanno dimostrato che il *cupping* e il *tunnel handling* sono superiori alla presa per la coda nel ridurre i segni di paura e lo stress fisiologico (Hurst et al., 2010).

L'adozione di tecniche di manipolazione rispettose del benessere animale è il primo e più importante passo per ridurre lo stress da manipolazione. Questa riduzione dello stress si traduce in un gran numero di benefici: animali più calmi e gestibili, minori episodi di aggressività verso l'operatore, e un ambiente di lavoro più sicuro e piacevole per il personale. Inoltre, come già discusso, la riduzione dello stress cronico porta a dati sperimentali più puliti e riproducibili, riducendo la variabilità interindividuale.

L'efficacia di queste tecniche, e del mantenimento di un buon rapporto uomo-animale, dipende tuttavia dalla competenza e dalla sensibilità del personale. Una formazione adeguata e continua è quindi fondamentale. Il personale deve essere qualificato non solo sugli aspetti tecnici delle procedure, ma anche sulla lettura del linguaggio del corpo dell'animale, sulla prevenzione degli episodi di stress, e sull'importanza di un approccio calmo e prevedibile (Abelson et al., 2023). L'investimento nella formazione del personale ha un impatto sulla qualità della ricerca e sul benessere animale, in pieno accordo con i principi etici e normativi del D.Lgs. 26/2014.

6.5 Humane endpoints

Il concetto di "punto finale umano" (o *humane endpoint*) rappresenta uno dei cardini dell'applicazione del principio di Refinement. Esso viene definito come il momento più precoce in cui, in un esperimento, è possibile rilevare segni oggettivi di dolore, sofferenza, distress o morte imminente, sulla base dei quali si decide di intervenire per alleviare la sofferenza, ad esempio sopprimendo l'animale, o di modificare la procedura (Morton et al., 1993; Organisation for Economic Co-operation and Development, 2000). L'obiettivo è quello di evitare o ridurre al minimo la sofferenza animale, ottenendo al contempo i dati scientifici necessari. La scelta e l'implementazione di endpoint umani richiedono una pianificazione attenta e una conoscenza approfondita del modello sperimentale.

Un *humane endpoint* è un parametro misurabile e oggettivo che, quando raggiunto, indica che l'animale sta soffrendo a un livello inaccettabile e che il proseguimento dell'esperimento non è più giustificabile. L'istituzione di un endpoint umano non significa necessariamente l'interruzione dell'esperimento, ma può anche implicare l'adozione di misure palliative (come la somministrazione di analgesici) o il raggiungimento di un "punto di non ritorno", dopo il quale l'animale non può più recuperare e deve essere soppresso.

Gli endpoint clinici sono segni fisici e clinici osservabili, molti dei quali già discussi in precedenza (paragrafo 6.2). Gli endpoint clinici comuni includono:

- a) Perdita di peso superiore a una soglia predefinita (es. >20% del peso iniziale).
- b) Grave disidratazione o deperimento.
- c) Ipotermia (temperatura corporea <35°C).

- d) Grave piloerezione e mantello opaco/incolto.
- e) Distress respiratorio (respiro affannoso, colorazione cianotica).
- f) Lesioni cutanee estese o necrosi tumorale (in modelli oncologici).
- g) Prolasso di organi.

Invece, per quanto riguarda gli endpoint comportamentali, essi sono basati sull'osservazione del comportamento dell'animale e possono essere più precoci rispetto ai segni clinici. Esempi includono:

- a) Isolamento sociale e mancanza di risposta agli stimoli.
- b) Incapacità di nutrirsi o bere (anoressia, adipsia).
- c) Grave letargia e prostrazione.
- d) Posture anomale indicative di dolore.
- e) Comportamenti autolesionistici.
- f) Perdita delle capacità motorie (es. incapacità di mantenere la stazione eretta, paresi).

Per garantire una valutazione obiettiva e standardizzata, è essenziale l'uso di schede di valutazione (*score sheet*) o schemi di punteggio (*scoring systems*). Questi strumenti assegnano un punteggio numerico a diversi parametri clinici e comportamentali, consentendo di quantificare il livello di sofferenza. Il punteggio totale viene poi confrontato con un valore soglia predefinito. Se il punteggio supera la soglia, viene attivato un protocollo di intervento (ad esempio, soppressione dell'animale) (Hendriksen et al., 1999). L'uso di schede di valutazione standardizzate rende la valutazione più trasparente, riproducibile e meno soggetta all'interpretazione soggettiva del singolo osservatore.

La frequenza con cui gli animali devono essere monitorati dipende dalla natura e dalla gravità della procedura sperimentale. Nella fase acuta, dove si prevede un rapido deterioramento delle condizioni (es. dopo un intervento chirurgico o in modelli di sepsi), il monitoraggio può essere richiesto ogni 15-30 minuti. In studi cronici, come i modelli tumorali, il monitoraggio può essere effettuato una o due volte al giorno. L'importante è che la frequenza sia adeguata a cogliere il peggioramento delle condizioni in tempo per intervenire, prevenendo sofferenze inutili.

La responsabilità ultima della definizione e dell'applicazione degli *humane endpoints* ricade sul veterinario designato e, in ultima analisi, sul ricercatore. Il veterinario fornisce consulenza scientifica sulla scelta degli *endpoint* più appropriati, sulla formazione del personale per il loro riconoscimento, e sulla decisione di intervento. La collaborazione tra ricercatore e veterinario è fondamentale per bilanciare le esigenze della ricerca con il dovere etico di minimizzare la sofferenza.

L'implementazione di endpoint umani è una delle applicazioni più dirette e potenti del principio di Refinement. L'obiettivo non è solo di evitare la morte come endpoint, ma di sostituirla con un indicatore di sofferenza più precoce, umano e scientificamente valido. Inoltre, l'uso di endpoint umani è spesso un prerequisito per ottenere l'approvazione del progetto da parte dell'organismo preposto al benessere animale (OpBA), come sancito dal D.Lgs. 26/2014.

6.6 Anestesia, analgesia e procedure

Le procedure chirurgiche e quelle che comportano dolore rappresentano una sfida significativa per il benessere degli animali. L'uso appropriato di anestetici e analgesici non è solo un obbligo legale (come stabilito dal D.Lgs. 26/2014), ma è essenziale per garantire il benessere animale, minimizzare il dolore e lo stress e, di conseguenza, ottenere dati scientifici validi, poiché il dolore non trattato altera profondamente la fisiologia dell'animale (Roughan et al., 2003).

La scelta del protocollo anestesilogico (combinazione di farmaci, via di somministrazione, dosaggio) deve essere basata su una serie di fattori, tra cui la specie, il ceppo, l'età, lo stato di salute dell'animale, la durata e il tipo di procedura chirurgica, e le esigenze del progetto di ricerca. Non esiste un protocollo universale. È fondamentale utilizzare un regime che garantisca un piano adeguato di anestesia (perdita di coscienza, analgesia e rilassamento muscolare) con il minimo impatto sulla fisiologia dell'animale. Le combinazioni di farmaci iniettabili (es. ketamina + xilazina, tiletamina + zolazepam) o inalatorie (es. isoflurano) sono comunemente impiegate. I protocolli devono essere validati e approvati dall'OpBA.

La gestione del dolore non si limita al periodo intraoperatorio. L'analgesia deve essere iniziata prima dell'insorgenza del dolore (analgesia preventiva) e continuata nel periodo post-operatorio,

per un tempo adeguato alla gravità e alla durata della procedura. Farmaci come i FANS (es. meloxicam, carprofen) e gli oppioidi (es. buprenorfina, butorfanolo) sono utilizzati singolarmente o in combinazione (analgesia multimodale) per ottenere un controllo del dolore più efficace con minori effetti collaterali (Stokes et al., 2009).

Durante l'intervento chirurgico, l'animale deve essere costantemente monitorato per garantire la profondità dell'anestesia e la stabilità dei parametri vitali. I parametri da monitorare includono la frequenza cardiaca, la frequenza respiratoria, la saturazione dell'ossigeno (SpO₂), la temperatura corporea (che deve essere mantenuta con fonti di calore esterno) e il colore delle mucose. Nel periodo post-operatorio, il monitoraggio continua con la valutazione del recupero (tempo di risveglio, capacità di nutrirsi e bere), dei segni vitali e, soprattutto, dei segni di dolore. Un animale che mostra segni di dolore nonostante l'analgesia deve essere valutato per un aggiustamento della terapia.

Il periodo di recupero post-operatorio rappresenta un momento critico. L'animale deve essere tenuto in un ambiente caldo e tranquillo, con facile accesso a cibo e acqua. Le gabbie di recupero devono essere dotate di *nesting material* per il comfort termico. L'animale deve essere osservato frequentemente fino al completo recupero, quando riprende a nutrirsi e a bere in modo autonomo e mostra un comportamento normale. La durata e le modalità del recupero devono essere definite nel protocollo sperimentale.

Un'anestesia e un'analgesia inadeguate possono avere conseguenze disastrose sul benessere animale, causando dolore, stress, ansia, e di conseguenza anche sulla qualità dei dati. Uno scarso recupero può compromettere anche l'assunzione di cibo e acqua, portando ad una perdita di peso e ad un peggioramento dello stato di salute. Al contrario, un'efficace gestione del dolore e del benessere durante le procedure chirurgiche è un investimento per ottenere dati scientifici più affidabili e riproducibili.

6.7 Soppressione eutanasica

La soppressione eutanasica è il termine che indica la procedura di soppressione di un animale per ragioni umane, con lo scopo di provocargli una perdita di coscienza e portarlo alla morte senza

dolore o angoscia. È l'atto finale, spesso inevitabile, di un esperimento e deve essere eseguito con la massima competenza e rispetto per l'animale.

I metodi di eutanasia devono essere selezionati in base alla specie, all'età e alle condizioni dell'animale, e devono essere approvati dall'OpBA. Il D.Lgs. 26/2014 e le linee guida internazionali, come quelle dell'AVMA (*American Veterinary Medical Association*), elencano i metodi considerati umani. Per i roditori, i metodi più comunemente utilizzati e accettati sono i seguenti.

Overdose di anestetici iniettabili: È considerato il metodo di elezione in molte situazioni. Si somministra una dose letale di un anestetico (es. pentobarbital sodico) per via intraperitoneale o endovenosa, che provoca una rapida perdita di coscienza seguita da arresto cardiorespiratorio. È un metodo rapido e relativamente indolore se somministrato correttamente.

Anossia da CO₂: È uno dei metodi più diffusi per l'eutanasia di massa dei roditori. Comporta l'esposizione ad una concentrazione crescente di anidride carbonica (CO₂) in una camera sigillata. Sebbene sia considerato accettabile, è stata sollevata una crescente preoccupazione riguardo al fatto che la CO₂ possa causare distress respiratorio, irritazione delle mucose e una sensazione di soffocamento (Conlee et al., 2005). Le linee guida attuali raccomandano un riempimento lento della camera (con un flusso che sostituisca il 10-30% del volume della camera al minuto) per ridurre al minimo lo stress. La saturazione del 100% di CO₂ deve essere mantenuta per un tempo sufficiente a garantire la morte (almeno 5-10 minuti per i topi).

Dislocazione cervicale: È un metodo fisico che consiste nella lussazione del collo (dislocazione cervicale) o nella lussazione atlanto-occipitale (separazione del cranio dalla colonna vertebrale). È un metodo rapido e non richiede attrezzature, ma deve essere eseguito solo da personale altamente addestrato per essere efficace e per minimizzare la sofferenza. È un metodo che suscita forti obiezioni etiche e la sua accettabilità è limitata.

Decapitazione: Metodo utilizzato quando è necessario ottenere tessuti cerebrali non contaminati da farmaci o quando è richiesta una rapida inattivazione enzimatica. È un metodo che richiede

un'abilità notevole e il personale deve essere adeguatamente addestrato. È considerato un metodo umano se eseguito rapidamente e con *guillotine* ben mantenute.

La scelta del metodo di eutanasia più appropriato dipende da diversi criteri. Il criterio prioritario è l'efficacia e la rapidità di induzione della perdita di coscienza e della morte senza sofferenza. Altri criteri includono la compatibilità con la specie e la dimensione dell'animale, la sicurezza per l'operatore (ad esempio, l'esposizione a gas tossici), l'impatto sulle procedure sperimentali (ad esempio, il metodo di prelievo dei tessuti) e le considerazioni pratiche (costo, disponibilità di attrezzature). L'OpBA valuta e approva i metodi proposti caso per caso. L'esecuzione dell'eutanasia è una responsabilità importante che richiede competenze tecniche e sensibilità, e dovrebbe essere eseguita solo da personale adeguatamente formato e competente. La formazione deve coprire gli aspetti teorici, quali farmacologia, fisiologia ed etologia, gli aspetti pratici, quali tecniche di somministrazione, funzionamento delle apparecchiature e tecniche di dislocazione, ed infine gli aspetti etici, per ridurre lo stress dell'operatore e garantire il rispetto per l'animale (Howard e Nevalainen, 2010).

In ultimo luogo, la morte deve essere sempre confermata prima di procedere con lo smaltimento della carcassa. La conferma si basa sull'assenza di battito cardiaco, rilevabile tramite palpazione del torace o ECG, sull'assenza di respiro e sulla mancanza di risposta a stimoli dolorosi come la pressione sul polpastrello, e sul riflesso pupillare con assenza di risposta alla luce (AVMA, 2013). L'uso di più metodi di conferma è sempre raccomandato per evitare errori.

Nel complesso, l'eutanasia deve essere eseguita con il massimo rispetto per l'animale e con una consapevolezza delle implicazioni etiche. Il D.Lgs. 26/2014 sancisce il principio che gli animali devono essere soppressi con metodi che riducano al minimo il dolore e la sofferenza. La corretta esecuzione di questa procedura è un atto di responsabilità che chiude il ciclo di cura dell'animale e rappresenta un momento cruciale per la credibilità etica dell'intera istituzione.

CAPITOLO 7 - Sostenibilità degli allevamenti sperimentali di roditori

7.1 Concetto di sostenibilità applicato agli stabulari

La sostenibilità negli allevamenti sperimentali di roditori rappresenta una sfida complessa e multidimensionale, che si inserisce nel più ampio dibattito sulla responsabilità ambientale, economica e sociale della ricerca scientifica. Applicare il concetto di sostenibilità ad uno stabulario significa andare oltre la sola conformità normativa, creando una visione sistemica che integri quattro pilastri fondamentali.

Sostenibilità ambientale

La dimensione ambientale riguarda l'impronta ecologica complessiva della struttura, comprendendo il consumo di energia e acqua, la produzione di rifiuti, l'utilizzo di materiali monouso e le emissioni di gas serra. Uno stabulario sostenibile minimizza il proprio impatto ambientale attraverso scelte progettuali e gestionali precise, contribuendo agli obiettivi di decarbonizzazione del settore della ricerca. La pianificazione delle infrastrutture per la ricerca animale richiede un alto livello di coerenza e sostenibilità, e risulta particolarmente critico per studi di lunga durata come quelli sull'invecchiamento (Wells e Bellantuono, 2016).

Sostenibilità economica

La sostenibilità economica si traduce nella capacità di garantire la funzionalità dello stabulario nel tempo con risorse finanziarie adeguate. I costi operativi degli allevamenti sperimentali sono significativi: manutenzione degli impianti, personale qualificato, materiali di consumo, energia e acqua. Una gestione economicamente sostenibile ottimizza l'uso delle risorse, riducendo gli sprechi e investendo in tecnologie efficienti che, seppur costose inizialmente, generano risparmi nel lungo termine. La crioconservazione, come discusso da *The Jackson Laboratory*, rappresenta un esempio paradigmatico: i costi di congelamento di una linea animale vengono generalmente recuperati attraverso il risparmio sui costi di mantenimento delle gabbie in pochi mesi.

Sostenibilità sociale ed etica

Questa dimensione include il benessere animale, la salute e sicurezza del personale, la responsabilità verso la comunità ed il rispetto dei principi etici della ricerca. La sostenibilità sociale

nello stabulario si realizza attraverso condizioni di lavoro adeguate, formazione continua del personale, trasparenza nelle pratiche di ricerca e impegno costante per il miglioramento del benessere animale.

Sostenibilità scientifica

Il quarto pilastro, spesso trascurato, riguarda la qualità intrinseca della ricerca. Dati scientifici solidi e riproducibili rappresentano la forma più alta di sostenibilità, poiché evitano sprechi di risorse (animali, tempo, denaro) in esperimenti inconcludenti. Una ricerca di scarsa qualità costituisce un doppio spreco: etico, per gli animali utilizzati inutilmente, ed economico, per i finanziamenti dissipati. La sostenibilità scientifica si realizza attraverso una rigorosa pianificazione sperimentale, l'adozione di standard di reporting come le linee guida ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*), la formazione statistica dei ricercatori e l'implementazione del principio delle 3R, sancito dal D.Lgs. 26/2014.

7.2 Consumo energetico

Il consumo energetico rappresenta una delle voci di costo e di impatto ambientale più significative negli stabulari per roditori, dove il mantenimento di condizioni ambientali controllate è essenziale per il benessere animale e la validità scientifica degli esperimenti.

Ventilazione e climatizzazione

I sistemi di ventilazione e climatizzazione costituiscono i maggiori consumi di energia in uno stabulario. Il mantenimento di temperature (generalmente 20-24°C), umidità relativa (40-70%) e ricambi d'aria costanti richiede un dispendio energetico considerevole, soprattutto in strutture di grandi dimensioni. I sistemi di ventilazione a recupero di calore possono ridurre significativamente i consumi, così come l'adozione di sistemi di controllo intelligenti che adattano i parametri ambientali alle effettive esigenze.

Sistemi IVC

I sistemi a ventilazione individuale delle gabbie (*Individually Ventilated Cages*, IVC) hanno rivoluzionato la gestione degli stabulari, offrendo un ambiente controllato per ciascuna gabbia e riducendo il rischio di contaminazione crociata. Tuttavia, questi sistemi comportano un consumo

energetico aggiuntivo per la ventilazione forzata di ogni singola gabbia. Le specifiche tecniche dei sistemi IVC indicano che i ricambi d'aria all'interno delle gabbie devono mantenere una variazione non superiore al $\pm 15\%$ rispetto al valore medio su tutti i livelli del rack. L'efficienza energetica di questi sistemi dipende dalla progettazione dei plenum di distribuzione dell'aria e dalla qualità dei motori di ventilazione.

Filtrazione HEPA

I filtri HEPA (*High-Efficiency Particulate Air*), essenziali per garantire la purezza dell'aria in ingresso e in uscita dalle gabbie IVC, richiedono una gestione attenta per bilanciare efficacia filtrante e consumo energetico. La sostituzione periodica dei filtri, indicata da sistemi di monitoraggio della pressione o da timer, deve essere effettuata tempestivamente per evitare un aumento della resistenza al flusso d'aria che comporterebbe un maggior consumo energetico. I filtri di grado H13 o H14 rappresentano lo standard per la maggior parte delle applicazioni in stabulario.

Illuminazione

L'illuminazione degli stabulari deve rispettare i cicli luce-buio essenziali per il benessere e i ritmi circadiani dei roditori. L'adozione di sistemi LED a basso consumo, l'utilizzo di sensori di presenza e la regolazione automatica dell'intensità luminosa in base alle diverse zone e orari possono ridurre significativamente i consumi.

Autoclavi e lavagabbie

Le autoclavi e le lavagabbie sono tra i principali responsabili del consumo energetico e idrico negli stabulari. La sterilizzazione a vapore di gabbie, accessori e materiali richiede temperature elevate ($121-134^{\circ}\text{C}$) e consumi energetici notevoli. Le lavagabbie industriali, che operano a temperature di $80-90^{\circ}\text{C}$, combinano consumo energetico e idrico. L'ottimizzazione dei carichi di lavaggio e sterilizzazione, la manutenzione regolare e l'adozione di cicli eco-compatibili sono strategie fondamentali per ridurre l'impatto.

Possibilità di miglioramento dell'efficienza energetica

Numerose strategie possono migliorare l'efficienza energetica degli stabulari, come sottolineato da Zynda nel contesto del WW IVC Symposium: l'adozione di strumenti come la metodologia di comparazione dei consumi, basata sugli standard ISO 14040 e ISO 14044:2006, può guidare le

decisioni su attrezzature critiche dimostrando come scelte iniziali basate esclusivamente sul costo di acquisto possano rivelarsi economicamente svantaggiose nel lungo periodo. Audit energetici periodici, manutenzione programmata degli impianti, isolamento termico adeguato e recupero del calore prodotto dalle apparecchiature sono ulteriori interventi efficaci.

7.3 Consumo idrico

L'acqua è una risorsa preziosa e sempre più scarsa, il cui consumo negli stabulari deve essere attentamente monitorato e ottimizzato.

Lavaggio gabbie

Il lavaggio delle gabbie è la principale fonte di consumo idrico, richiedendo volumi significativi per rimuovere residui organici, lettiera e agenti patogeni. Le lavagabbie a tunnel o a vasca consumano quantità d'acqua variabili in base al modello, al carico e al ciclo selezionato. L'adozione di sistemi di ricircolo dell'acqua, la selezione di cicli di lavaggio ottimizzati e la manutenzione regolare degli ugelli di risciacquo possono ridurre i consumi.

Abbeveratoi e sistemi automatici

I sistemi di abbeveraggio automatico, sebbene riducano il lavoro del personale e garantiscano un approvvigionamento costante, possono essere fonte di sprechi in caso di perdite o malfunzionamenti. I sistemi a bottiglia, più tradizionali, richiedono invece un maggiore impegno nella gestione e nel lavaggio. La scelta del sistema deve bilanciare benessere animale, efficienza operativa e consumo idrico.

Autoclavi

Le autoclavi richiedono acqua per la generazione di vapore e per i sistemi di raffreddamento. L'adozione di autoclavi con sistemi di recupero del calore e di riduzione del consumo idrico, come i generatori di vapore integrati a basso consumo, contribuisce alla sostenibilità complessiva della struttura.

Pulizia e sanificazione

Oltre alle lavagabbie, il consumo idrico include la pulizia di pavimenti, superfici e attrezzature. L'utilizzo di sistemi di pulizia a basso consumo, la formazione del personale sulle tecniche di risparmio idrico e l'adozione di detergenti biodegradabili sono pratiche efficaci.

Strategie per ridurre sprechi

La riduzione degli sprechi idrici passa attraverso interventi tecnici e gestionali: installazione di contatori per il monitoraggio dei consumi, individuazione tempestiva di perdite, ottimizzazione dei cicli di lavaggio, riutilizzo delle acque di risciacquo per pre-lavaggio, e formazione del personale sulle buone pratiche di risparmio idrico. Inoltre, l'adozione di sistemi automatizzati consente di contenere significativamente lo spreco idrico complessivo, agendo non solo sul circuito di abbeveraggio, ma anche sui processi di pulizia e lavaggio delle gabbie e degli ambienti.

7.4 Rifiuti prodotti dagli stabulari

La gestione dei rifiuti è una delle sfide ambientali più significative per gli stabulari, richiedendo classificazione, trattamento e smaltimento differenziati. La corretta classificazione dei rifiuti secondo la normativa vigente (D.Lgs. 152/2006 e successive modifiche) è fondamentale per garantire uno smaltimento sicuro e conforme. Le categorie includono rifiuti pericolosi e non pericolosi, biologici, chimici, farmacologici e radioattivi. Negli stabilimenti utilizzatori, nei quali sono presenti animali in procedura sperimentale, i rifiuti vengono considerati tutti pericolosi e pertanto smaltiti e distrutti attraverso lo stoccaggio in contenitori di plastica neri chiusi irreversibilmente, successivamente smaltiti da ditte specializzate.

La lettiera esausta costituisce il principale rifiuto solido prodotto, in termini di volume. Costituita da trucioli di legno, carta o materiali vegetali, contaminata da urine, feci e peli, deve essere smaltita come rifiuto biologico pericoloso. La possibilità di compostaggio o digestione anaerobica per lettieri non contaminate da agenti patogeni o sostanze pericolose rappresenta una prospettiva di sostenibilità.

Anche le carcasse di animali deceduti o sacrificati devono essere smaltite come rifiuti biologici, seguendo procedure specifiche per prevenire rischi sanitari. La gestione sostenibile include la riduzione del numero di animali in surplus e l'ottimizzazione delle pratiche di eutanasia.

Gran parte dei rifiuti solidi consistenti è costituita da guanti, mascherine, camici, tappetini e altri materiali monouso. La scelta tra materiali monouso e riutilizzabili, valutata attraverso l'analisi del ciclo di vita (*Life Cycle Assessment*, LCA), deve bilanciare sicurezza, praticità e impatto ambientale. I dispositivi di protezione individuale (DPI), essenziali per la sicurezza del personale, generano rifiuti plastici e tessili. Per ridurre l'impatto si prediligono DPI riutilizzabili, quando consentito dalle normative di biosicurezza, e il riciclo di materiali.

Per quanto riguarda i rifiuti biologici, essi includono tessuti, fluidi e materiali contaminati. I rifiuti speciali comprendono, invece, sostanze chimiche, farmaci, prodotti radioattivi e oggetti taglienti. La loro gestione richiede procedure specifiche e smaltimento presso impianti autorizzati.

Quanto ai rifiuti chimici o farmacologici, farmaci scaduti, disinfettanti, solventi e reagenti chimici costituiscono rifiuti pericolosi che richiedono smaltimento differenziato. La riduzione alla fonte, attraverso acquisti ponderati e gestione delle scadenze, è la strategia più efficace per minimizzare questa categoria di rifiuti.

7.5 Impatto dei materiali monouso

Il dibattito tra materiali monouso e riutilizzabili è centrale per la sostenibilità degli stabulari, richiedendo un'analisi approfondita degli impatti sull'intero ciclo di vita.

Riguardo alla scelta delle gabbie, tra gabbie monouso e riutilizzabili, è complessa e non scontata. Le gabbie monouso eliminano i consumi di acqua ed energia per il lavaggio e riducono i rischi di contaminazione crociata, ma generano ingenti rifiuti plastici e richiedono materie prime per la produzione continua. Le gabbie riutilizzabili, in polisulfone o altri materiali resistenti, richiedono lavaggio e sterilizzazione ma hanno una vita utile che può superare i 150 cicli di autoclave. L'analisi del ciclo di vita, come suggerito da Zynda (2014), deve considerare consumi, *carbon footprint* e costi operativi su tutta la vita della struttura. Alcuni studi preliminari indicano che i sistemi di gabbie riutilizzabili possono avere un impatto ambientale inferiore rispetto a quelli monouso, sebbene la generalizzazione richieda valutazioni caso per caso.

Quanto ai filtri per gabbie IVC, generalmente in materiale sintetico, devono essere sostituiti periodicamente. La scelta tra filtri monouso e rigenerabili e l'ottimizzazione degli intervalli di sostituzione influenzano l'impatto ambientale e i costi operativi.

Anche le bottiglie per l'acqua, in polisulfone o polipropilene, possono essere monouso o riutilizzabili. Le bottiglie riutilizzabili richiedono lavaggio e sterilizzazione ma riducono i rifiuti plastici. Il design dei beccucci e dei sistemi di chiusura, come quelli con O-ring in silicone, influisce sulla durata e sull'efficacia.

In merito ai DPI monouso, in particolare guanti e mascherine, generano rifiuti significativi. La preferenza per DPI riutilizzabili, come camici in tessuto lavabile, e la corretta selezione dei materiali possono ridurre l'impatto. Tuttavia, per motivi di natura sanitaria e di rispetto del benessere animale, il loro impiego non è praticabile, né in stabilimenti convenzionali né in stabilimenti SPF.

Una quota rilevante dei rifiuti, inoltre, è rappresentata da sacchi per lettiera, imballaggi per mangimi e materiali di consumo. L'adozione di imballaggi ridotti, materiali riciclati e sistemi di resa dei contenitori contribuisce alla sostenibilità.

La valutazione del ciclo di vita (LCA), secondo gli standard ISO 14040 e ISO 14044, rappresenta lo strumento più completo per confrontare l'impatto ambientale di diverse opzioni, considerando estrazione materie prime, produzione, trasporto, uso e smaltimento. L'applicazione dell'LCA agli stabulari, sebbene ancora limitata, è in crescita e sta rivelando scelte controintuitive. Ad esempio, tramite uno studio (McGain et al, 2017), è stato dimostrato in ambito sanitario come la conversione da attrezzature monouso a riutilizzabili in un ospedale australiano abbia comportato una riduzione dei costi annuali del 46%, un dato che suggerisce potenziali benefici anche per gli stabulari.

7.6 Sostenibilità nella gestione delle colonie

La gestione delle colonie animali rappresenta un punto cruciale per la sostenibilità, dove il principio delle 3R trova applicazione concreta.

La riduzione degli animali in surplus, ovvero non utilizzati negli esperimenti, è un imperativo etico ed economico. Come menzionato precedentemente, la pianificazione attenta della produzione, l'ottimizzazione dei genotipi e l'adozione di tecniche di crioconservazione possono ridurre drasticamente il numero di animali allevati "per precauzione". Una pianificazione rigorosa degli accoppiamenti, basata su modelli genetici e demografici, consente di ottenere il numero necessario di animali del genotipo desiderato minimizzando gli scarti. L'uso di sistemi informatizzati per la gestione delle colonie e il monitoraggio dei parametri riproduttivi supporta questa pianificazione.

La crioconservazione, ovvero il congelamento di materiale biologico (spermatozoi, ovociti, embrioni) a temperature ultra-basse, è una tecnologia consolidata per preservare linee animali geneticamente modificate senza mantenerle in colonia viva. Come affermato da *The Jackson Laboratory*, la crioconservazione consente lo stoccaggio a lungo termine di linee preziose o attualmente non utilizzate senza i costi e lo sforzo dell'allevamento continuo, consentendo anche un rapido ripristino delle colonie quando necessario, riducendo in ultima analisi il numero di animali utilizzati e abbassando i costi complessivi. La crioconservazione degli spermatozoi è il metodo più efficiente anche in termini di spazio: una singola cannuccia contenente dieci microlitri di sperma, con fino a un milione di spermatozoi, può far rivivere un numero enorme di animali. La crioconservazione protegge anche da eventi catastrofici: l'alluvione del *NYU Langone Medical Center* causata dall'uragano Sandy nel 2012 cancellò oltre 3.000 linee di topi, con un impatto economico decine di milioni di dollari e, più devastante, la perdita di linee preziose per le quali non esistevano riserve crioconservate. Uno studio (Myelnikov e Peres, 2023) ha evidenziato come la crioconservazione, diffusa a partire dagli anni '70, abbia permesso ai ricercatori di superare timori di perdita delle linee, disapprovazione sociale e deriva genetica, contribuendo all'espansione della ricerca sui topi.

Anche la creazione di banche dati interne per la gestione delle colonie, dei genotipi e della loro localizzazione ottimizza le risorse e facilita la condivisione. L'integrazione con sistemi di fatturazione e tracciabilità delle gabbie consente una gestione più efficiente. Inoltre, la condivisione di linee animali tra gruppi di ricerca riduce la duplicazione di allevamenti. Anche dati centralizzate, come quelle gestite da MMRRC (*Mutant Mouse Resource and Research*

Centers) o KOMP2 (*Knockout Mouse Project*), facilitano lo scambio e la distribuzione di modelli animali, riducendo il numero complessivo di animali allevati.

Infine, il coordinamento tra gruppi di ricerca, attraverso riunioni periodiche e database condivisi, consente di ottimizzare l'uso delle risorse, pianificare esperimenti congiunti e ridurre duplicazioni inutili. Wells e Bellantuono (2016) sottolineano l'importanza di programmi collaborativi su larga scala per avanzare negli studi in modo tempestivo e conveniente.

7.7 Sostenibilità e qualità scientifica

La qualità della ricerca scientifica è il fondamento stesso della sostenibilità, poiché una scienza di scarsa qualità rappresenta lo spreco più grave di risorse, animali e opportunità.

Esperimenti mal progettati, statisticamente sottodimensionati o scarsamente riportati producono dati non riproducibili, vanificando il sacrificio animale e i finanziamenti investiti. Questo spreco è eticamente inaccettabile ed economicamente insostenibile. La riproducibilità della ricerca è un prerequisito per la sostenibilità: dati non riproducibili non generano conoscenza utile e richiedono la ripetizione di esperimenti, moltiplicando l'uso di animali e risorse.

La riproducibilità, quindi, è il fondamento del metodo scientifico. Per garantire che i risultati di un esperimento possano essere verificati da altri gruppi, è essenziale una documentazione completa e trasparente di tutte le variabili, incluse le caratteristiche degli animali (ceppo, sesso, età, condizioni di allevamento), i protocolli sperimentali, le condizioni ambientali e le metodologie statistiche. Il reporting trasparente è il primo passo verso la riproducibilità. Le pubblicazioni scientifiche devono includere informazioni sufficienti per consentire ad altri ricercatori di replicare gli esperimenti. Questo include la descrizione dettagliata dei metodi, l'analisi statistica appropriata, la dichiarazione di eventuali conflitti di interesse e la disponibilità dei dati grezzi. Inoltre, l'interfaccia e la discussione dei progetti fra OpBA ed i vari enti ufficiali (Ministero della salute e Istituto superiore di sanità), garantiscono il rispetto delle 3 R e accertano la qualità scientifica.

La mancanza di riproducibilità è stata definita come una vera e propria crisi nella ricerca biomedica, con costi economici enormi e implicazioni etiche profonde per la sperimentazione animale. Le linee guida ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*), sviluppate dal NC3Rs (*National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research*), forniscono un elenco di elementi essenziali da includere nelle pubblicazioni che descrivono ricerche condotte su animali. La loro adozione è considerata una *best practice* per garantire la trasparenza e la riproducibilità. La soddisfazione degli standard ARRIVE è sempre più richiesta dalle riviste scientifiche e dagli enti finanziatori.

7.8 Strategie pratiche di miglioramento

Numerose strategie concrete possono essere implementate per migliorare la sostenibilità degli stabulari, dalla progettazione alla gestione quotidiana.

Audit energetici periodici, condotti da esperti, identificano le aree di maggior consumo e le opportunità di risparmio. L'analisi dei consumi di ventilazione, climatizzazione, illuminazione e attrezzature, basata su dati di monitoraggio, permette di pianificare interventi mirati di efficientamento. La manutenzione programmata di impianti e attrezzature (ventilazione, climatizzazione, autoclavi, lavagabbie) previene guasti, ottimizza le prestazioni e prolunga la vita utile delle apparecchiature, contribuendo alla sostenibilità economica e ambientale. La digitalizzazione dei registri di stabulario, dalla gestione delle colonie al monitoraggio ambientale, riduce l'uso di carta, migliora l'efficienza operativa e facilita il controllo di qualità. Sistemi integrati possono fornire allarmi automatici, tracciabilità delle gabbie e ottimizzazione dei carichi di lavoro.

Il cambio gabbia, sebbene necessario per il benessere animale, è un'attività ad alto impatto; l'ottimizzazione degli intervalli di cambio in base al numero di animali, al tipo di gabbia e al sistema di ventilazione può ridurre significativamente i consumi. Sistemi di monitoraggio intelligente, come descritto da Wells e Bellantuono (2016), consentono di valutare i fabbisogni reali degli animali. La valutazione critica della necessità di arricchimento aggiuntivo deve bilanciare i benefici per il benessere animale con il maggiore carico di lavoro e consumo di risorse (Cait et al., 2024).

Anche l'adozione di sistemi di monitoraggio ambientale intelligenti, che rilevano in tempo reale temperatura, umidità, ricambi d'aria e altri parametri, consente di ottimizzare le condizioni senza sprechi. La possibilità di integrare il monitoraggio con sistemi di allarme remoto e *Building Management Systems* (BMS) migliora l'efficienza e la sicurezza.

La formazione del personale sulle pratiche di sostenibilità (risparmio energetico e idrico, gestione dei rifiuti, 3R) è anch'esso un investimento fondamentale. Personale consapevole adotta comportamenti idonei nella routine quotidiana e contribuisce all'identificazione di nuove opportunità di miglioramento.

L'adozione di politiche di acquisto sostenibili privilegia, inoltre, fornitori che dimostrano attenzione all'ambiente (materiali riciclati, imballaggi ridotti, processi produttivi a basso impatto).

Infine, l'ottimizzazione della logistica, dall'approvvigionamento dei materiali allo smaltimento dei rifiuti, riduce i trasporti e i consumi. La pianificazione centralizzata degli acquisti, la riduzione degli ordini urgenti e la scelta di fornitori locali contribuiscono alla sostenibilità complessiva.

CAPITOLO 8 - Applicazione pratica delle 3R nella gestione degli allevamenti

L'applicazione concreta del principio delle 3R (Replacement, Reduction, Refinement), introdotto da Russell e Burch nel 1959, rappresenta il cardine operativo per gli allevamenti sperimentali che intendono coniugare il rigore scientifico con il rispetto del benessere animale, come sancito dal D.Lgs. 26/2014. La sua attuazione richiede un approccio integrato che interviene in ogni fase della vita dell'animale in stabulario, dalla progettazione sperimentale alla gestione quotidiana, fino alla valutazione dei risultati.

8.1 Replacement nella fase di progettazione

Il principio di sostituzione (Replacement) mira a evitare o sostituire, ove possibile, l'uso di animali senzienti. Nella fase di progettazione, questo si traduce in un'approfondita ricerca bibliografica preventiva per identificare modelli in vitro, in silico o metodi alternativi già validati. L'utilizzo di banche dati specializzate e di modelli computazionali preliminari consente di affinare le ipotesi e ridurre gli esperimenti sugli animali. Lo screening in vitro, prima di procedere con studi in vivo, funge da filtro essenziale per testare la tossicità o l'efficacia di base di un composto, selezionando solo i candidati più promettenti e riducendo così il ricorso agli animali. Un esempio pratico di sostituzione è l'adozione del monitoraggio sanitario ambientale (*Environmental Health Monitoring*) in sostituzione dell'utilizzo di animali sentinella, come dimostrato dall'esperienza dell'Università di Chicago, che ha eliminato l'uso di oltre 1.600 animali all'anno, con un significativo risparmio economico (Luchins et al, 2026).

8.2 Reduction nella pianificazione sperimentale

La riduzione (Reduction) si concentra sulla minimizzazione del numero di animali utilizzati, garantendo al contempo la validità statistica dei risultati. Il calcolo della numerosità campionaria (*power analysis*) rappresenta uno strumento fondamentale, che definisce il numero minimo di soggetti necessario per ottenere risultati significativi. I disegni fattoriali e gli studi longitudinali, che prevedono misurazioni ripetute sugli stessi animali, contribuiscono notevolmente a questo scopo. Ad esempio, l'imaging non invasivo come la risonanza magnetica (MRI) rappresenta una tecnologia chiave per la Reduction: Obrecht et al (2023) dimostrano come, in modelli murini di

infiammazione polmonare, l'uso di MRI abbia permesso di ridurre il numero di animali necessari da 96 a soli 12, grazie alla possibilità di eseguire misurazioni ripetute nel tempo e di utilizzare ciascun animale come controllo di sé stesso, riducendo la variabilità. La condivisione di gruppi di controllo e la creazione di biobanche per la conservazione di campioni biologici sono ulteriori strategie per ottimizzare l'uso delle risorse animali.

8.3 Reduction nella gestione riproduttiva

La gestione delle colonie, in particolare quelle transgeniche, offre ampie opportunità per la Reduction. Una previsione accurata del fabbisogno di animali, basata su un'attenta pianificazione degli esperimenti e sul coordinamento tra ricercatori e personale dello stabulario, evita la produzione di animali in eccesso. Per le colonie transgeniche, la crioconservazione di spermatozoi ed embrioni è una pratica consolidata che sostituisce il mantenimento continuo di linee animali non immediatamente necessarie, riducendo drasticamente il numero di animali allevati, i costi e i rischi di perdita di ceppi preziosi. L'implementazione delle 3R nella transgenesi dei roditori richiede un approccio metodico che copra tutte le fasi, dalla pianificazione alla gestione della colonia, riducendo i genotipi non necessari (Buch et al, 2023).

8.4 Refinement nelle pratiche quotidiane

Il perfezionamento (Refinement) riguarda tutte le misure volte a migliorare il benessere animale riducendo stress, dolore e sofferenza. Nella routine quotidiana dello stabulario, ciò si traduce in pratiche come il cambio gabbia meno stressante, che prevede la conservazione parziale del materiale da nido per mantenere l'odore familiare e ridurre l'ansia. L'*handling* non avversivo, che sostituisce la presa per la coda con metodi come il *tunnel handling* o il sollevamento a mano, è un miglioramento fondamentale documentato in letteratura. Uno studio (Henderson et al., 2020) ha dimostrato che i topi manipolati con il tunnel mostrano una maggiore interazione volontaria con l'operatore e minori segni di ansia nei test comportamentali, anche dopo procedure potenzialmente stressanti come ripetute iniezioni intraperitoneali o anestesia con isoflurano. La minimizzazione delle manipolazioni, la riduzione del rumore e l'acclimatazione degli animali prima delle procedure sono ulteriori accorgimenti che contribuiscono a creare un ambiente più stabile, in linea con quanto richiesto dal D.Lgs. 26/2014.

8.5 Refinement nelle procedure sperimentali

Anche durante le procedure sperimentali, il Refinement gioca un ruolo cruciale. L'adozione di tecniche meno invasive, come il prelievo ematico ottimizzato (ad esempio dalla vena facciale o dalla coda dopo riscaldamento), riduce il disagio dell'animale. Il monitoraggio del benessere tramite score clinici e scale del dolore, come la *Mouse Grimace Scale* (Capitolo 6.2), consente una valutazione oggettiva e precoce del dolore. La *Mouse Grimace Scale*, validata per topi e ratti (Akintola et al., 2017), analizza le espressioni facciali per rilevare dolore spontaneo, superando i limiti dei metodi tradizionali che spesso sottostimano il dolore cronico. L'analgesia adeguata, le tecniche chirurgiche mini-invasive e l'uso di imaging e telemetria per il monitoraggio a distanza sono tutte pratiche che riducono lo stress e il dolore, migliorando al contempo la qualità e la riproducibilità dei dati raccolti.

8.6 Indicatori per valutare l'efficacia delle 3R

Per valutare l'efficacia delle strategie 3R, è necessario monitorare una serie di indicatori chiave. Questi includono il numero di animali effettivamente utilizzati e il numero di animali prodotti ma non utilizzati, un indicatore di spreco e di inefficienza della pianificazione. La gravità cumulativa delle procedure, la mortalità non programmata, la frequenza di endpoint anticipati e i parametri di benessere (come il peso, il comportamento, i marcatori fisiologici dello stress) forniscono un quadro del livello di sofferenza complessivo.

Un modello di riferimento consolidato in questo ambito è il cubo di Bateson (Bateson, 1986), uno strumento etico sviluppato da Sir Patrick Bateson per assistere i comitati etici nella valutazione progettuale attraverso un'analisi costi-benefici (Bateson et al., 2004). Questo cubo (Immagine 3) si sviluppa lungo tre assi: la qualità della ricerca, la probabilità di un progresso per la salute umana o per la conoscenza scientifica, e la quantità di sofferenza causata all'animale (Bateson, 2005). Secondo il modello, la ricerca è considerata eticamente accettabile solo quando il valore di tutti e tre gli assi si colloca nella porzione "trasparente" del cubo (Cuthill, 2007), rendendo esplicito il giudizio etico intrinseco alla sperimentazione animale. Lo strumento, pur non essendo un modello formale per ottimizzazioni, fornisce una struttura trasparente per il processo decisionale,

richiedendo che i benefici attesi giustifichino la sofferenza inflitta (Bateson, 1986; McMahon et al., 2012).

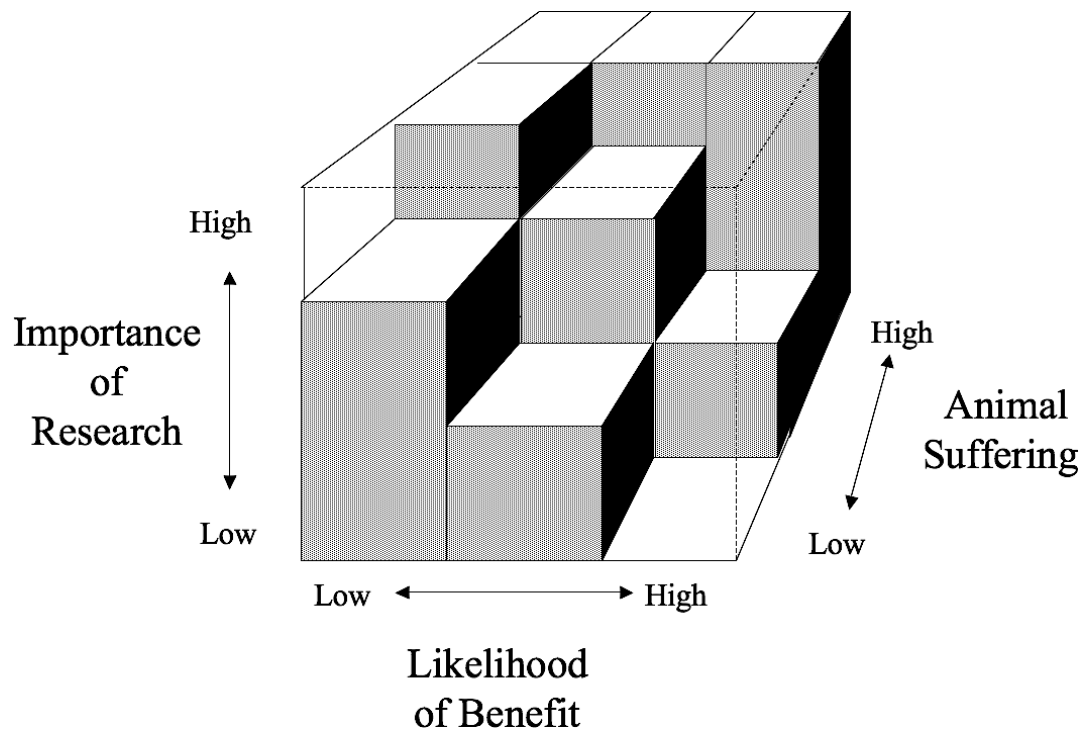


Immagine 3: cubo di Bateson. Immagine presa e modificata da Pound & Nicol. 2018.

Infine, la qualità e la riproducibilità dei dati scientifici prodotti rappresentano un indicatore cruciale: un'applicazione efficace delle 3R non solo migliora il benessere animale, ma produce anche dati più robusti e affidabili, riducendo la variabilità e aumentando la validità scientifica della ricerca.

CAPITOLO 9 - Ruolo del medico veterinario e del personale tecnico

9.1 Il medico veterinario designato

Per attuare correttamente il D.Lgs. 26/2014 e applicare pienamente il principio delle 3R (Russell e Burch, 1959) negli allevamenti sperimentali di roditori, è necessario un approccio integrato e multidisciplinare. In questo contesto, il medico veterinario designato svolge un ruolo fondamentale. Come delineato dal decreto, il veterinario designato non è un semplice consulente occasionale, ma una figura centrale per la sorveglianza sanitaria e la consulenza sul benessere (D.Lgs. 26/2014, Art. 12). Il suo ruolo è stato ampiamente riconosciuto come centrale per la gestione del benessere animale e l'implementazione delle 3R (Chipangura et al., 2025; Golledge e Richardson, 2024). La sua funzione si estende dalla valutazione clinica degli animali al supporto cruciale nelle scelte di anestesia, analgesia e nella definizione degli endpoint umani, contribuendo a minimizzare il dolore e la sofferenza (Chipangura et al., 2025). Inoltre, il veterinario designato interviene clinicamente su tutti gli animali che non sono inseriti in progetti e procedure. In questa attività, il veterinario opera in stretta collaborazione con l'Organismo Preposto al Benessere degli Animali (OpBA) e i ricercatori, fungendo da mediatore tra le esigenze della ricerca e l'obbligo etico di garantire il massimo livello di benessere possibile, favorendo un dialogo costruttivo per la progettazione di protocolli sperimentali sempre più raffinati (Codecasa et al., 2021).

9.2 Il personale addetto alla cura degli animali

Parallelamente, il personale tecnico addetto alla cura quotidiana degli animali rappresenta il primo e più importante osservatore per il rilevamento di segni preclinici di dolore, stress o malessere. La sua formazione obbligatoria, come sancito dal D.Lgs. 26/2014 e dal D.Lgs 5 agosto 2021, deve essere continuativa e comprendere non solo nozioni teoriche ma anche una solida preparazione pratica sulla conoscenza della specie (Hubrecht e Kirkwood, 2010). È questa conoscenza specifica che consente il riconoscimento precoce di variazioni comportamentali o fisiche indicative di dolore e stress, spesso sottili, che possono precedere i parametri clinici evidenti, rendendo possibile un intervento tempestivo (Morton et al., 2001). La gestione quotidiana, che include la manipolazione, l'alimentazione e la pulizia, quando eseguita con

competenza e rispetto, non solo previene fonti di stress ma rafforza una relazione di fiducia nei confronti dell'uomo che facilita le procedure sperimentali. Una comunicazione efficace e bidirezionale tra questo personale, il veterinario designato e il responsabile del progetto è quindi fondamentale per un flusso informativo che consenta una gestione dinamica e reattiva del benessere animale (Chipangura et al., 2026).

9.3 Formazione e competenza

La formazione e la competenza, in questo contesto, non sono un traguardo ma un processo in evoluzione. Il D.Lgs. 26/2014 (All. V) insieme al D.Lgs 5 agosto 2021 stabiliscono i requisiti minimi, ma una vera "cultura della cura" (*culture of care*) si radica in un impegno costante all'aggiornamento continuo e alla documentazione delle competenze, in cui il personale è incoraggiato a riflettere criticamente sulle proprie pratiche (Ameli & Krämer, 2024). Questo approccio formativo, che integra moduli di formazione teorica e formazione pratica, è essenziale per sviluppare la sensibilità e la manualità necessarie a ridurre al minimo l'impatto delle procedure sugli animali, migliorando al contempo la riproducibilità dei dati scientifici. L'obiettivo finale è quello di instaurare una vera e propria cultura della cura, in cui il benessere animale diventa un valore condiviso e non un adempimento burocratico.

9.4 Comunicazione interna

Infine, tale sistema virtuoso si regge su una solida comunicazione interna, in cui il flusso di informazioni tra stabulario, ricercatori, veterinario e OpBA è strutturato e trasparente. Riunioni periodiche, la segnalazione tempestiva delle non conformità e protocolli chiari per la gestione degli imprevisti non sono solo adempimenti burocratici, ma strumenti di miglioramento continuo che consentono di identificare aree di criticità e implementare soluzioni condivise (Hawkins & Dukes, 2018). Solo attraverso questa sinergia tra competenze e comunicazione è possibile tradurre i principi del D.Lgs. 26/2014 in pratiche quotidiane che elevano gli standard etici e scientifici della ricerca in vivo.

CAPITOLO 10 - Criticità attuali e prospettive future

10.1 Criticità scientifiche

La validità della ricerca preclinica condotta su modelli roditori è messa in discussione da molteplici fattori biologici e metodologici che limitano la traslazione dei risultati all'uomo e compromettono la riproducibilità degli studi.

La traslabilità dei modelli roditori rappresenta una delle criticità più importanti. La ricerca animale è finalizzata principalmente allo studio delle malattie umane e alla ricerca di potenziali trattamenti; di conseguenza, la massimizzazione del valore traslazionale dei risultati per i pazienti dovrebbe assumere un ruolo centrale nella progettazione sperimentale (Diederich et al., 2024). Tuttavia, a guidare la scelta del modello animale sono spesso fattori pratici, il che potrebbe non riflettere caratteristiche fondamentali dei pazienti, come sesso ed età, che influenzano l'insorgenza e il decorso della malattia (Diederich et al., 2024). Un'indagine condotta su quasi 300 ricercatori ha identificato fattori pratici come costo, disponibilità degli animali o comparabilità con dati storici come elementi chiave nella scelta del modello, indipendentemente dalla malattia studiata (Diederich et al., 2024).

La variabilità biologica è stata tradizionalmente considerata un fattore di disturbo da controllare tramite standardizzazione, ma questa strategia potrebbe paradossalmente aggravare la crisi di riproducibilità (von Kortzfleisch & Richter, 2024). Studi recenti suggeriscono che la variazione sistematica delle condizioni sperimentali, piuttosto che la loro omogeneizzazione, giova alla robustezza dei risultati e quindi alla loro riproducibilità (von Kortzfleisch & Richter, 2024). La standardizzazione rigorosa può creare condizioni talmente artificiali da produrre risultati validi solo in contesti ristretti, non generalizzabili ad altri laboratori (von Kortzfleisch & Richter, 2024). Si stima che oltre la metà degli studi preclinici su modelli animali negli Stati Uniti sia considerata non riproducibile, con un costo di circa 28 miliardi di dollari all'anno (von Kortzfleisch & Richter, 2024).

L'influenza del microbiota è emersa come un fattore critico di variabilità interlaboratorio. Il microbiota dei topi da laboratorio convenzionali, mantenuti in condizioni *specific-pathogen-free*

(SPF), è il risultato di ripetute ridefinizioni *germ-free* e ricolonizzazioni in ambienti di laboratorio restrittivi, con conseguente perdita di microrganismi co-evoluti naturalmente (Runge et al., 2025). Tale microbiota manca della complessità e resilienza di quello naturale e viene rapidamente sostituito da microbiota selvatico in condizioni di *co-housing* (Runge et al., 2025). Un'ampia letteratura dimostra che il microbiota divergente tra fornitori commerciali e istituzioni di ricerca è una causa primaria della crisi di riproducibilità globale, poiché la combinazione di microbiota e genoma dell'ospite determina il fenotipo (Runge et al., 2025). La documentazione della composizione del microbiota e di tutti i fattori influenzanti non corregge il problema sottostante della sua divergenza, rendendo quasi impossibile tenere conto di ogni variabile (Runge et al., 2025).

Le differenze tra ceppi, sesso ed età rappresentano ulteriori fonti di variabilità sistematica. Per lungo tempo si è ipotizzato che l'inclusione di animali di sesso femminile non fosse rilevante al di fuori degli studi sul sistema riproduttivo e che il ciclo estrale aggiungesse una variabilità indesiderata (Kentner et al., 2021). Questa concezione erronea ha portato a una preferenza per l'utilizzo dei soggetti maschi in molti ambiti di ricerca (Kentner et al., 2021). Tuttavia, evidenze successive hanno confutato questa ipotesi, dimostrando che il sesso influenza la maggior parte dei tratti fenotipici nel topo e che l'inclusione di entrambi i sessi produce risultati più robusti e generalizzabili (Kentner et al., 2021). Organismi finanziatori come i *National Institutes of Health* (NIH) richiedono ora ai ricercatori di giustificare l'utilizzo di un solo sesso, e diverse riviste biomediche hanno adottato le linee guida SAGER (*Sex And Gender Equity in Research*) (Hodges et al., 2022). Una valutazione iniziale a dieci anni dall'introduzione di queste misure ha rivelato una riduzione del *bias* di sesso, sebbene il miglioramento non sia stato uniforme in tutti i campi di ricerca (Hodges et al., 2022).

L'età dei roditori utilizzati rappresenta un fattore ancora meno discusso ma altrettanto critico. Molte malattie sono correlate all'età, eppure la scelta dell'età del roditore potrebbe non riflettere l'età dei pazienti (Diederich et al., 2024). Un'indagine ha rilevato che l'età dei roditori utilizzati tende a concentrarsi intorno alle 8-12 settimane per topi e ratti, indipendentemente dal modello di malattia studiato (Diederich et al., 2024). Tale età corrisponde a un giovane adulto nell'uomo. Uno studio pilota su cinque malattie correlate all'età (morbo di Alzheimer, ictus, diabete mellito di tipo 2, cardiopatia ischemica e broncopneumopatia cronica ostruttiva) ha evidenziato notevoli

discrepanze: mentre per l'ictus e la cardiopatia ischemica l'età mediana dei topi si attestava intorno alle 10 settimane, per il morbo di Alzheimer l'età mediana era di 43,5 settimane (Diederich et al., 2024). Tale variabilità suggerisce che, in alcuni casi, i modelli animali potrebbero non rappresentare adeguatamente la popolazione di pazienti target, limitando la validità esterna degli studi (Diederich et al., 2024).

10.2 Criticità etiche

La sperimentazione animale è soggetta a un rigoroso esame etico, sancito a livello europeo dalla Direttiva 2010/63/UE e in Italia dal D.Lgs. 26/2014, che impone un bilanciamento tra progresso scientifico e tutela del benessere animale, come analizzato in precedenza.

La necessità di giustificazione scientifica costituisce il presupposto fondamentale per qualsiasi procedura. La normativa italiana si caratterizza per un approccio che non si limita a porre obblighi minimi, ma mira a veicolare l'andamento futuro della ricerca nei casi in cui risulti necessario l'utilizzo della sperimentazione animale (Barletta, 2021). Il D.Lgs. 26/2014 vieta specifiche procedure, tra cui quelle per la produzione e il controllo di materiale bellico, per i test tossicologici con protocolli LD50 e LC50 (salvo obblighi normativi), per la produzione di anticorpi monoclonali tramite induzione dell'ascite (qualora esistano metodi alternativi), per le ricerche sugli xenotrapianti e per le ricerche sulle sostanze d'abuso (Barletta, 2021). Questi divieti, più restrittivi rispetto alla Direttiva europea, hanno suscitato dibattito e sono oggetto di una procedura d'infrazione da parte della Commissione Europea, sollevando interrogativi sul rapporto tra autonomia legislativa nazionale e primato del diritto dell'Unione (Barletta, 2021).

La valutazione danno-beneficio costituisce il fulcro dell'autorizzazione dei progetti di sperimentazione. Ogni procedura deve essere valutata in termini di potenziale danno per l'animale (sofferenza, dolore, angoscia) e beneficio atteso per la ricerca scientifica, la salute umana o animale o l'ambiente. Il D.Lgs. 26/2014, come norma al contempo immediatamente precettiva e di programma, delinea una disciplina che non si preoccupa solo di vincolare, ma anche di elevare gli standard rispetto alla direttiva recepita (Barletta, 2021).

La trasparenza verso la società e la percezione pubblica della sperimentazione animale rappresentano sfide comunicative e relazionali significative. La sperimentazione animale è un argomento dibattuto e complesso, spesso al centro di numerose polemiche (Barletta, 2021). Il Regolamento 2019/1010 ha modificato la Direttiva 2010/63/UE per rendere più trasparente il processo di sperimentazione, aumentando gli obblighi dei ricercatori e prevedendo un database europeo ad accesso aperto per la pubblicazione delle statistiche annuali e dei risultati dei progetti (Barletta, 2021). La corretta attuazione della Direttiva in Italia è stata tuttavia rallentata dalle divergenti opinioni in Parlamento in merito all'etica della sperimentazione e al benessere degli animali (Barletta, 2021).

10.3 Criticità gestionali

La gestione di uno stabulario per roditori sperimentali comporta notevoli sfide organizzative, economiche e logistiche, che si riflettono sulla qualità della ricerca e sul benessere animale.

La complessità normativa deriva dal recepimento della Direttiva 2010/63/UE, che ha introdotto standard elevati ma anche un quadro regolatorio articolato, con differenze interpretative tra gli Stati membri. L'Italia, in particolare, ha adottato misure più restrittive rispetto ad altri Paesi, generando incertezze applicative e procedure di infrazione (Barletta, 2021). La corretta applicazione della Direttiva in Italia rimane bloccata anche a causa dell'art. 13 della Legge di Delegazione n. 96/2013, che ha impedito al legislatore di emanare una legge che prevedesse l'utilizzo di animali in esperimenti su xenotrapianti e sostanze d'abuso, attualmente vietati dall'art. 5 del D.Lgs. 26/2014 (Barletta, 2021).

10.4 Innovazioni tecnologiche

L'integrazione di tecnologie avanzate sta trasformando la gestione degli stabulari, offrendo opportunità per migliorare il benessere animale, la qualità dei dati e l'efficienza operativa in ottica 3R.

La digitalizzazione dello stabulario e l'installazione di sensori ambientali consentono un monitoraggio continuo e in tempo reale delle condizioni di allevamento, superando i limiti dei

controlli periodici. L'approccio del *Precision Livestock Farming* (PLF), proveniente dalla zootecnia, si basa su strumenti per la gestione degli animali attraverso il monitoraggio continuo e automatizzato in tempo reale della produzione/riproduzione, della salute e del benessere, nonché dell'impatto ambientale (Vetmeduni Vienna, 2025). Sebbene sviluppati principalmente per il bestiame, questi principi sono trasferibili alla gestione degli stabulari per roditori. La continua integrazione di tecnologie di visione computerizzata, come il rilevamento di oggetti, il rilevamento di punti chiave o il tracciamento, per monitorare la salute, il benessere e la produttività degli animali, sta diventando sempre più diffusa (Chae et al., 2025).

Sono in fase di sviluppo sistemi multimodali che combinano dati audio e video per identificare comportamenti anomali e generare report comportamentali, come dimostrato in ambito suinicolo per l'identificazione di suini che urlano in risposta a stress (Chae et al., 2025).

Anche l'intelligenza artificiale applicata al monitoraggio del benessere sta emergendo come strumento potente. Modelli di *deep learning* e reti neurali, combinati con tecniche di *self-attention* e LSTM (*Long Short-Term Memory*), consentono di elaborare dati multimodali per identificare pattern comportamentali e produrre analisi in linguaggio naturale tramite *Large Language Models* (LLM) (Chae et al., 2025). Questi sistemi, oltre a rilevare eventi di stress, possono generare report dettagliati sul profilo comportamentale di ciascun animale, supportando decisioni gestionali più informate (Chae et al., 2025).

La gestione informatizzata delle colonie, infine, rappresenta un passo fondamentale verso una pianificazione più razionale, come menzionato in precedenza. Si stanno sviluppando strumenti online, come il *Multigeneration Breeding Planner* (MBP), che modellano matematicamente i risultati dell'allevamento e raccomandano strategie che producono il numero richiesto di animali sperimentali con il minor numero di eccedenze (Swiss 3R Competence Centre, 2025). Questi strumenti incorporano la genetica mendeliana, i tassi di fertilità, le dimensioni delle cucciolate e altri parametri biologici per fornire previsioni probabilistiche, consentendo una gestione proattiva invece che reattiva delle colonie (Swiss 3R Competence Centre, 2025).

10.5 Verso stabulari più sostenibili

La sostenibilità ambientale degli stabulari sta diventando un obiettivo prioritario, in linea con il principio delle 3R e con le crescenti pressioni sociali verso una ricerca più responsabile.

Una progettazione degli spazi efficiente è il primo passo per ridurre l'impatto ambientale. La progettazione di una struttura dovrebbe considerare l'eco-efficienza sin dalla fase iniziale, con un focus sulla riduzione dei consumi energetici e degli sprechi (Diaz et al., 2025). Il concetto di un centro di ricerca unificato con strutture animali di grandi dimensioni, che allocano aree sperimentali con attrezzature specifiche, sta diventando sempre più diffuso e consente di unificare politiche e strategie di prezzo, facilitando l'integrazione di modelli animali e vegetali in un'unica struttura (Diaz et al., 2025). L'automazione e la centralizzazione dei processi di sanificazione, fisicamente separati dagli edifici di ricerca, consentono di risparmiare risorse e offrono vantaggi organizzativi (Diaz et al., 2025). La versatilità è una caratteristica fondamentale: adattare attrezzature di seconda mano per stabilire nuove strutture di allevamento è un caso di successo presentato in letteratura (Diaz et al., 2025).

La riduzione dei consumi energetici, inoltre, è una priorità. Le strutture animali devono bilanciare la necessità di mantenere condizioni ambientali precise (temperatura, umidità, ventilazione) con l'obiettivo di minimizzare l'impronta di carbonio. L'implementazione di sistemi di monitoraggio e controllo avanzati, la scelta di materiali e attrezzature efficienti e l'adozione di strategie di gestione energetica possono contribuire a questo obiettivo. La riduzione dei consumi si integra con la riduzione dei costi operativi, un aspetto non trascurabile per la sostenibilità economica delle strutture (Diaz et al., 2025).

La riduzione degli sprechi riguarda sia i materiali che gli animali. L'ottimizzazione dei processi di sanificazione, la riduzione dell'uso di plastica monouso e la corretta gestione dei rifiuti biologici sono azioni concrete per ridurre l'impatto ambientale. Il percorso verso la riduzione dell'impatto ambientale non è semplice quando si parla di un'attività che produce tonnellate di rifiuti al giorno, ma istituzioni come l'Istituto Pasteur hanno avviato iniziative di sviluppo sostenibile per affrontare questa sfida ambiziosa (Diaz et al., 2025).

Una migliore pianificazione sperimentale rappresenta forse lo strumento più efficace per ridurre l'impatto ambientale e migliorare il benessere animale. La produzione di soli animali necessari, evitando eccedenze, riduce i consumi, i rifiuti e il numero di animali sacrificati. La pianificazione accurata, basata su stime precise del fabbisogno e sull'ottimizzazione degli schemi di allevamento, è fondamentale per implementare una gestione proattiva delle colonie (Mesbah & Ayadi, 2026; Swiss 3R Competence Centre, 2025).

L'integrazione tra sostenibilità ambientale e principio delle 3R è il paradigma emergente. La riduzione del numero di animali utilizzati (Reduce), il perfezionamento delle procedure per minimizzare la sofferenza (Refine) e la sostituzione con metodi alternativi (Replace) sono obiettivi che si allineano naturalmente con la riduzione dell'impatto ambientale e dei costi. La pianificazione efficiente, il monitoraggio automatizzato, l'imaging non invasivo e l'uso di modelli computazionali contribuiscono contemporaneamente al benessere animale, alla qualità della ricerca e alla sostenibilità ambientale (Diaz et al., 2025).

10.6 Prospettive di progressiva sostituzione

Nonostante i progressi, il modello roditore rimane centrale nella ricerca biomedica, ma lo sviluppo di metodi alternativi sta accelerando, offrendo prospettive realistiche di sostituzione parziale in aree specifiche.

Lo sviluppo di metodi alternativi è fortemente sostenuto dalla Direttiva 2010/63/UE e dal D.Lgs. 26/2014. La normativa incoraggia gli Stati membri a sviluppare nuovi metodi di ricerca al fine di sostituire e ridurre l'uso di animali o, almeno, perfezionare i metodi in cui vengono utilizzati (Barletta, 2021). L'obiettivo è triplice: migliorare il benessere animale, armonizzare le legislazioni degli Stati membri e promuovere l'innovazione scientifica (Barletta, 2021).

Organoidi e *organ-on-chip* (OOC) rappresentano una delle frontiere più promettenti. La tecnologia OOC utilizza un dispositivo microfluidico di coltura cellulare costituito da un microchip con camere perfuse in continuazione, popolate da cellule viventi strutturate per replicare i processi fisiologici a livello di tessuto e organo (Pun et al., 2021). Questi microchip possono replicare funzioni chiave degli organi, consentendo l'imaging ad alta risoluzione e in tempo reale

delle attività biochimiche, genetiche e metaboliche delle cellule viventi in contesti tissutali e organici funzionali (Ingber, 2022). La tecnologia consente di ridurre significativamente il numero di animali utilizzati negli esperimenti, garantisce un'elevata riproducibilità dei risultati e offre la possibilità di utilizzare simultaneamente più tipi cellulari in un singolo modello (Park et al., 2024). Esempi includono modelli di fegato-on-a-chip, ipotalamo-ipofisi-on-a-chip e modelli di malattie neurodegenerative come la sclerosi laterale amiotrofica e il morbo di Parkinson (Park et al., 2024). Tuttavia, l'applicazione richiede attrezzature specializzate, competenze avanzate e attualmente comporta costi elevati; raggiungere il livello di standardizzazione necessario per la commercializzazione rimane una sfida (Park et al., 2024). Recenti progressi nella biologia delle cellule staminali e degli organoidi, nella tecnologia OOC e nella bioprinting 3D hanno contribuito a un enorme progresso nella capacità di progettare, assemblare e produrre sistemi biomimetici di organi viventi che riflettono più accuratamente le caratteristiche strutturali e funzionali del tessuto umano in vitro, consentendo previsioni migliori delle risposte umane a farmaci e stimoli ambientali (Ingber, 2022).

I modelli computazionali e l'analisi dei dati omici (genomica, trascrittomica, proteomica, metabolomica) stanno diventando sempre più potenti, consentendo di simulare processi biologici complessi e di predire risposte a farmaci o tossine senza ricorrere a modelli animali. Questi approcci, integrati con i dati provenienti da modelli in vitro, stanno contribuendo a una comprensione più profonda dei meccanismi patologici e a una migliore progettazione degli studi (Lu et al., 2024).

Gli approcci integrati denominati NAMs (*New Approach Methodologies*) rappresentano la strategia più avanzata. Le NAMs combinano diverse tecnologie innovative (OOC, modelli computazionali, saggi in vitro ad alto rendimento, dati omici) in un quadro integrato per valutare la sicurezza e l'efficacia di composti chimici e farmaci, riducendo al minimo la dipendenza da modelli animali (Lu et al., 2024). La loro adozione è in crescita in settori come la tossicologia regolatoria, dove l'obiettivo è la transizione verso una valutazione del rischio basata su meccanismi biologici umani (Lu et al., 2024). Tuttavia, permangono barriere scientifiche, tecniche, legislative ed economiche, oltre a ostacoli culturali legati alla familiarità con i metodi consolidati (Sewell et al., 2024).

I limiti attuali e le realistiche prospettive future devono essere riconosciuti. La tecnologia OOC, sebbene promettente, non è ancora in grado di replicare la complessità sistemica di un organismo vivente, inclusi i sistemi immunitario, endocrino e nervoso integrato, le interazioni tra organi e la risposta allo stress e all'invecchiamento (Nature Reviews Bioengineering, 2023). Gli organoidi, ad esempio, mancano di una struttura vascolare che ne limita la crescita e la maturazione, portando a differenze di comportamento rispetto al tessuto originale (Park et al., 2024). Inoltre, attualmente non esiste un modello in vitro in grado di sostituire un intero organismo umano (Park et al., 2024). La complessità della ricerca sulle malattie multifattoriali e sullo sviluppo di nuovi trattamenti richiede ancora modelli animali per la validazione in vivo. Le prospettive future vedono un'integrazione crescente tra modelli animali e metodi alternativi, con un uso sempre più mirato e razionale dei roditori, in linea con il principio delle 3R (Arkell et al, 2025). La sfida è quella di sviluppare e convalidare NAMs che possano essere accettate dalle autorità regolatorie per scopi specifici, riducendo gradualmente la dipendenza dalla sperimentazione animale, senza compromettere la sicurezza e l'efficacia delle terapie per i pazienti (Sewell et al., 2024; Lu et al., 2024).

Conclusioni

La presente tesi ha analizzato la gestione degli allevamenti sperimentali di roditori, evidenziando come l'integrazione tra rigore scientifico, benessere animale e sostenibilità rappresenti la sfida centrale per la ricerca in vivo contemporanea.

L'analisi condotta dimostra che il modello roditore, nonostante i suoi innegabili limiti in termini di traslabilità e variabilità biologica, rimane attualmente insostituibile per lo studio di processi fisiologici complessi e patologie multifattoriali che richiedono l'integrazione di molteplici sistemi organici. La sostituzione completa della sperimentazione animale, sebbene costituisca l'obiettivo verso cui la comunità scientifica e il quadro normativo europeo tendono, non è al momento fattibile: le metodologie alternative, per quanto in rapido progresso, non sono ancora in grado di replicare la complessità sistemica di un organismo vivente nella sua interezza.

Tuttavia, è altrettanto evidente che l'utilizzo di animali vivi nella ricerca è divenuto un'attività sempre più difficoltosa e onerosa. Il D.Lgs. 26/2014, ha introdotto standard normativi estremamente rigorosi che impongono una valutazione approfondita di ogni progetto, una classificazione della severità delle procedure e una giustificazione scientifica obbligatoria. Questo quadro normativo, unitamente alla crescente sensibilità etica della società e alle pressioni economiche legate ai costi gestionali, ha determinato una significativa riduzione quantitativa della sperimentazione animale, che oggi viene condotta solo quando strettamente necessaria e in assenza di alternative valide.

La sperimentazione animale si caratterizza per standard di benessere elevati: l'arricchimento ambientale, le tecniche di handling, il monitoraggio continuo del benessere attraverso indicatori clinici e comportamentali, e l'adozione di humane endpoints rappresentano ormai prassi consolidate, obblighi etici e scientifici. La qualità della ricerca e il benessere animale si sono rivelati non in conflitto, ma strettamente interdipendenti: un animale che vive in condizioni ottimali produce dati più robusti, riproducibili e scientificamente validi.

La sostenibilità, infine, si configura come il paradigma emergente che orienta il futuro degli stabulari. Sostenibilità ambientale, attraverso la riduzione dei consumi energetici e idrici e la gestione responsabile dei rifiuti; sostenibilità economica, mediante l'ottimizzazione delle risorse

e la riduzione degli sprechi; sostenibilità sociale, garantendo condizioni di lavoro adeguate e trasparenza verso la collettività; e sostenibilità scientifica, fondata sulla qualità e riproducibilità dei dati. Queste quattro dimensioni, integrate con il principio delle 3R, delineano un modello di ricerca in vivo che si muove responsabilmente verso un futuro in cui l'animale usato ai fini sperimentali sarà sempre più un'eccezione giustificata e sempre meno una consuetudine.

Bibliografia

- Abelson K. S. P., Chambers C., De La Cueva T., Fisher G., Hawkins P., Ntafis V., Pohli, P. F., Rooymans T. P., Santo, A. I. Harmonisation of education, training and continuing professional development for laboratory animal caretakers, technicians and technologists: Report of the FELASA-EFAT Working Group. 2023. doi: 10.1177/00236772231175550
- Agriculture Victoria. Code of Practice for the Housing and Care of Laboratory Mice, Rats, Guinea Pigs and Rabbits. Part 3.1 Nutrition. 2020.
- Akintola T., Raver C., Studlack P., Uddin O., Masri R., Keller A. The grimace scale reliably assesses chronic pain in a rodent model of trigeminal neuropathic pain. 2017. doi: 10.1016/j.ynpai.2017.10.001.
- Ameli K. & Krämer S. Transforming Culture: A Culture of Care in Animal Research. 2024. doi: 10.1163/15685306-BJA10213
- Ankeny R.A., Davies G.F., Kirk R.G.W., Whittaker A.L., Johnson J. Lessons for the Future of NAMs from History, Philosophy and Social Studies of Science. 2024. doi: 10.1177/02611929241267763.
- Arkell R.M., Wolvetang E.J., Gulati T., Hennessy J.E., Hill A.P., Jardé T., Kueh A.J., Thomas P.Q., Winteringham L.N., Dobbie M.S. Complementarity and integration of animal and in vitro non-animal pre-clinical model systems- an Australian perspective. 2025. doi: 10.1007/s00335-025-10132-0.
- Avila A.M., Bebenek I., Bonzo J.A., Bourcier T., Davis Bruno K.L., Carlson D.B., Dubinion J., Elayan I., Harrouk W., Lee S.L., Mendrick D.L., Merrill J.C., Peretz J., Place E., Saulnier M., Wange R.L., Yao J., Zhao D., Brown P.C. An FDA/CDER perspective on nonclinical testing strategies: Classical toxicology approaches and new approach methodologies (NAMs). 2020. doi: 10.1016/j.yrtph.2020.104662
- AVMA (American Veterinary Medical Association). AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition.
- Balcombe J.P., Barnard N.D., Sandusky C. Laboratory routines cause animal stress. 2004. PMID: 15669134.
- Barletta, M. (2021). Animal testing in Europe: the incidence of Directive 2010/63 EU among member states and its role in the development of the Covid-19 vaccine. 2021. doi: 10.15168/2284-4503-808

- Bateson P. Ethics and behavioural biology. 2005. doi: 10.1016/S0065-3454(05)35005-8.
- Bateson P. When to experiment on animals. 1986.
- Bateson P., Biggs P., Cuthbert A., Cuthill I.C., Festing M., Keverne E.B., King S., Page C., Petersen O., Rothwell N., Rushworth M., Walsh V., & Roberts O. The use of non-human animals in research: a guide for scientists. 2004. doi: 10.1177/026119290403200209.
- Baumans V. Environmental Enrichment for Laboratory Rodents and Rabbits: Requirements of Rodents, Rabbits, and Research. 2005. doi: 10.1093/ilar.46.2.162
- Bayne K. & Würbel H. The impact of environmental enrichment on the outcome variability and scientific validity of laboratory animal studies. 2014. doi: 10.20506/rst.33.1.2282
- Bayne K. Potential for Unintended Consequences of Environmental Enrichment for Laboratory Animals and Research Results. 2005. doi: 10.1093/ilar.46.2.129
- Buch T., Jerchow B., Zevnik B. Practical Application of the 3Rs in Rodent Transgenesis. 2023. doi: 10.1007/978-1-0716-2990-1_2.
- Burn C.C., Peters A., Day M.J., Mason G.J. Long-term effects of cage-cleaning frequency and bedding type on laboratory rat health, welfare, and handleability: a cross-laboratory study. 2006. doi: 10.1258/002367706778476460.
- Cait J., Winder C. B. & Mason G. J. How much 'enrichment' is enough for laboratory rodents? A systematic review and meta-analysis re-assessing the impact of well-resourced cages on morbidity and mortality. 2024. doi: 10.1016/j.applanim.2024.106361.
- Chae H., Par, M., Noh B. A smart livestock framework for multimodal abnormally screaming pig identification and behavioral reporting in group-housed environments. 2025. doi: 10.1016/j.compag.2025.110909
- Chipangura J.K., Kanengoni A.T., Nederlof R.A., Bakker J., Naidoo V. A systematic review of the role of laboratory animal veterinarians in promoting One Welfare. 2026. doi: 10.1177/02611929251407622.
- Codecasa E., Pageat P., Marcet-Rius M. & Cozzi A. Legal Frameworks and Controls for the Protection of Research Animals: A Focus on the Animal Welfare Body with a French Case Study. 2021. doi: 10.3390/ani11030695
- Conlee K.M., Stephens M.L., Rowan A.N., King L.A. Carbon dioxide for euthanasia: concerns regarding pain and distress, with special reference to mice and rats. 2005. doi: 10.1258/0023677053739747

- Cuthill I.C. Ethical regulation and animal science: why animal behaviour is not so special. 2007. doi: 10.1016/j.anbehav.2007.04.003.
- Decreto Legislativo 4 marzo 2014, n. 26. Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, n. 59 del 12 marzo 2014.
- Diaz S.L., Sharp P., Warot X. Facility design and management: modern challenges and sustainability. 2025. doi: 10.1177/00236772241300775
- Diederich K., Steinfath M., Bannach-Brown A., Bert B., Butzke D., Wildner P. L., Wurm M., Schadock I. & Heintz C. Protocol for the systematic review of age and sex in preclinical models of age-correlated diseases. 2024. doi: 10.12688/f1000research.153466.2
- Domínguez-Oliva A., Hernández-Avalos I., Bueno-Nava A., Chávez C., Verduzco-Mendoza A., Olmos-Hernández A., Villanueva-García D., Avila-Luna A., Mora-Medina P., Martínez-Burnes J., Gálvez-Rosas A. and Mota-Rojas D. Environmental enrichment for laboratory rats and mice: endocrine, physiological, and behavioral benefits of meeting rodents' biological needs. 2025. doi: 10.3389/fvets.2025.1622417
- Elidio H.S.M., Coelho J.W.R., Silva L.C.C.P., Santos I.B. Housing Density and Aggression in Syrian Hamsters. 2021. doi: 10.30802/AALAS-JAALAS-21-000020
- FAWC (Farm Animal Welfare Council). FAWC updates the five freedoms. 1992.
- Feldman D.B., Seely J.C. Necropsy Guide: Rodents and the Rabbit. 1998. CRC Press.
- Ferrecchia C.E., Jensen K., Van Andel R. Intracage Ammonia Levels in Static and Individually Ventilated Cages Housing C57BL/6 Mice on 4 Bedding Substrates. 2014. doi: 10.30802/AALAS-JAALAS-14-000027
- Ford D.J. The effect of methods of sterilization on the nutritive value of protein in a commercial rat diet. 1976. doi: 10.1079/bjn19760031.
- Garattini, S. Farmacologia e sperimentazione animale. In Enciclopedia del Novecento, II Supplemento. 1998. Roma: Istituto dell'Enciclopedia Italiana Treccani.
- Garner J.P. & Mason G.J. The role of the "environment" in the development of stereotypic behaviour. In: Mason G., Rushen J., editors. Stereotypic Animal Behaviour: Fundamentals and Applications to Welfare. 2nd ed. 2006. p. 47-78.
- Gaskill B.N., Pritchett-Corning K.R., Gordon C.J., Pajor E.A., Lucas J.R., Davis J.K., Garner J.P. Energy reallocation to breeding performance through improved nest building in laboratory mice. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0074153.

- Golledge H. & Richardson C. (Eds.). The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals (9th ed.). 2024.
- Hartung, T. 2010/63/EU for the Protection of Laboratory Animals with its Predecessor 86/609/EEC - a t4 Report. 2010. doi: 10.14573/altex.2010.4.285
- Hawkins P. & Dukes J. Communication and the Culture of Care. Poster presented at the UFAW Conference. 2018. RSPCA. doi: 10.13140/RG.2.2.33865.80481
- Hedrich H.J., Bullock G.R., editors. The Laboratory Mouse. 2004. (Handbook of Experimental Animals)
- Henderson L. J., Dani B., Serrano E. M. N., Smulders T. V., & Roughan J. V. Benefits of tunnel handling persist after repeated restraint, injection and anaesthesia. 2020. doi: 10.1038/s41598-020-71476-y
- Hendriksen C. F. & Morton D. B. The use of humane endpoints in animal experiments. Report of the 1998 ECVAM Workshop. 1999.
- Hessler J. R. & Leary S. L. Design and management of animal facilities. Laboratory Animal Medicine (2nd ed., pp. 909-947). 2002. doi:10.1016/B978-012263951-7/50024-7
- Hirakawa, H. Coprophagy in leporids and other mammalian herbivores. 2001. doi:10.1046/j.1365-2907.2001.00079.x
- Hodges T.E., Lee G.Y., Noh S.H., Galea L.A.M. Sex and age differences in cognitive bias and neural activation in response to cognitive bias. 2022. doi: 10.1016/j.ynstr.2022.100458
- Howard B. & Nevalainen T. Attaining competence in the care of animals used in research. R. Hubrecht & J. Kirkwood (Eds.), The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals (8th ed., pp. 194-205). 2010.
- Hubrecht R.C. & Kirkwood J.K. (Eds.). The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals. 8th ed. 2010.
- Hurst J. L. & West R. S. Taming anxiety in laboratory mice. 2010. doi: 10.1038/nmeth.1500
- Hurst J.L & West R.S. Taming anxiety in laboratory mice. 2010. doi: 10.1038/nmeth.1500.
- Hurst J.L., Barnard C.J., Tolladay U., Nevison C.M., West C.D. Housing and welfare in laboratory rats: effects of cage stocking density and behavioural predictors of welfare. 1999. doi: 10.1006/anbe.1999.1165.
- Ingber D.E. Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. 2022. doi: 10.1038/s41576-022-00466-9.

- Kallnik M., Elvert R., Ehrhardt N., Kissling D., Mahabir E., Welzl G., Faus-Kessler T., Hrabé de Angelis M., Wurst W., Schmidt J., Hölter S.M. Impact of IVC housing on emotionality and fear learning in male C3HeB/FeJ and C57BL/6J mice. 2007. doi: 10.1007/s00335-007-9002-z
- Kentner A.C., Speno A.V., Doucette J., Roderick R.C. The Contribution of Environmental Enrichment to Phenotypic Variation in Mice and Rats. 2021. doi: 10.1523/ENEURO.0539-20.2021.
- Klages C. IACUC and Veterinary Considerations for Review of ABSL3 and ABSL4 Research Protocols. 2022. doi: 10.1093/ilar/ilab009.
- Krinke G.J., editor. The Laboratory Rat. 2000. (Handbook of Experimental Animals).
- Langford D.J., Bailey A.L., Chanda M.L., Clarke S.E., Drummond T.E., Echols S., Glick S., Ingrao J., Klassen-Ross T., Lacroix-Fralish M.L., Matsumiya L., Sorge R.E., Sotocinal S.G., Tabaka J.M., Wong D., van den Maagdenberg A.M., Ferrari M.D., Craig K.D., Mogil J.S. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. 2010. doi: 10.1038/nmeth.1455.
- Lauwereyns J., Bajramovic J., Bert B., Camenzind S., De Kock J., Elezović A., Erden S., Gonzalez-Uarquin F., Isil Ulman Y., Hoffman, O. I., Kitsara M., Kostomitsopoulos N., Neuhaus W., Petit-Demouliere B., Pollo S., Riso B., Schober S., Sotiropoulos A., Thomas A., Vital, A., Wilflingseder D., Ahluwalia A. Toward a common interpretation of the 3Rs principles in animal research. 2024. doi: 10.1038/s41684-024-01476-2
- Lee K. M., Park K.-J., Lee N.-J. & Shin H.-S. Quality Control of Laboratory Animals in Laboratory Animal Facility of Infectious Diseases. 2024. doi: 10.56786/PHWR.2024.17.14.3
- Li R., Li X., Huang T., Wang Y., Xue M., Sun S., Yan D., Song G., Sun G., Li M. Influence of cecotrophy on fat metabolism mediated by caecal microorganisms in New Zealand white rabbits. 2020. doi: 10.1111/jpn.13309.
- Lin W.-C., Hoe B.-C., Li X., Lian D., Zeng X. Glucose Metabolism-Modifying Natural Materials for Potential Feed Additive Development. 2024. doi: 10.3390/pharmaceutics16091208
- Lu E.H., Rusyn I., Chiu W.A. Incorporating new approach methods (NAMs) data in dose-response assessments: The future is now! 2025. doi: 10.1080/10937404.2024.2412571.
- Luchins K.R., Felgenhauer J.L. Enhancing Rodent Welfare, Cost Savings, and Efficiency: Implementation and Review of Data-Driven Improvements. 2026. doi: 10.30802/AALAS-JAALAS-25-170.
- Mahler M., Berard M., Feinstein R., Gallagher A., Illgen-Wilcke B., Pritchett-Corning K., Raspa M. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig

- and rabbit colonies in breeding and experimental units. 2014. doi: 10.1177/0023677213516312
- Marx U., Akabane T., Andersson T.B., Baker E., Beilmann M., Beken S., Brendler-Schwab S., Cirit M., David R., Dehne E.M., Durieux I., Ewart L., Fitzpatrick S.C., Frey O., Fuchs F., Griffith L.G., Hamilton G.A., Hartung T., Hoeng J., Hogberg H., Hughes D.J., Ingber D.E., Iskandar A., Kanamori T., Kojima H., Kuehn J., Leist M., Li B., Loskill P., Mendrick D.L., Neumann T., Pallocca G., Rusyn I., Smirnova L., Steger-Hartmann T., Tagle D.A., Tonevitsky A., Tsyb S., Trapecar M., van de Water B., van den Eijnden-van Raaij J., Vulto P., Watanabe K., Wolf A., Zhou X., Roth A. Biology-Inspired Microphysiological Systems to Advance Patient Benefit and Animal Welfare in Drug Development. 2020. doi: 10.14573/altex.2001241
 - Maty H.N., Mohammed I.A., Adnan H.O., Hussein A.A., Kakel S.J. Reference physiological and biochemical values of adult albino rats. 2025. doi:10.33899/ijvs.2024.154123.3922.
 - McEwen B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. 2007. doi: 10.1152/physrev.00041.2006
 - McMahon C.R., Harcourt R., Bateson P., Hindell M.A. Animal welfare and decision making in wildlife research. 2012. doi: 10.1016/j.biocon.2012.05.004.
 - Mellor D.J. Updating Animal Welfare Thinking: Moving beyond the "Five Freedoms" towards "A Life Worth Living". 2016. doi: 10.3390/ani6030021.
 - Mesbah K. & Ayadi A. Reduction and Refinement of Genetically Altered Mouse Breeding: Controlling Quality and Quantity According to Experimental Needs. 2026. doi: 10.1002/cpz1.70313.
 - Ministero della Salute. Protezione animali utilizzati a fini scientifici. 2021. Available: <https://www.salute.gov.it/new/it/prodotti-editoriali/protezione-degli-animali-utilizzati-fini-scientifici/>
 - Mogil J.S. Animal models of pain: progress and challenges. 2009. doi: 10.1038/nrn2606.
 - Morton D.B. & Griffiths P.H. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. 1985. doi: 10.1136/vr.116.16.431.
 - Morton D.B., Jennings M., Batchelor G.R., Bell D., Brimelow L., Buckwell A., Ewbank R., Godfrey C., Holgate B., Inglis I., James R., Page C., Sharman I., Verschoyle R., Westall L., Wilson A.B. Refining procedures for the administration of substances. 2001. doi: 10.1258/0023677011911345

- Moula N., Duwez L., Merchie M., Lambert G., Briot L., Nivelles O., Drion P. Integrated method for mouse identification and genotyping: an innovative approach combining animal welfare, scientific reliability, and regulatory compliance. 46th Annual BCLAS Symposium Programme Book. University of Namur. 2025.
- Myelnikov D. & Peres S. The Cold Futures of Mouse Genetics: Modes of Strain Cryopreservation Since the 1970s. 2023. doi: 10.1177/01622439221138341.
- National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th ed.). 2011. National Academies Press.
- Nature Reviews Bioengineering. How human are our models? 2023. doi: 10.1038/s44222-023-00098-6
- Nature. Metabolic Availability of Vitamin C in the Guinea-pig. 1973. doi:10.1038/242519a0.
- Nature. Metabolic Availability of Vitamin C in the Guinea-pig. 1973. doi:10.1038/242519a0.
- Nicklas W., Homberger F.R., Illgen-Wilcke B., Jacobi K., Kraft V., Kunstyr I., Mähler M., Meyer H., Pohlmeyer-Esch G. Implications of infectious agents on results of animal experiments. Report of the Working Group on Hygiene of the Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS). 2002. doi: 10.1258/002367799780675779
- Obrecht M., Zurbrugg S., Accart N., Lambert C., Doelemeyer A., Ledermann B., Beckmann N. Magnetic resonance imaging and ultrasound elastography in the context of preclinical pharmacological research: significance for the 3R principles. 2023. doi: 10.3389/fphar.2023.1177421.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Series on Testing and Assessment, No. 19. 2000.
- Olsson I.A.S., Silva S.P.D., Townend D., and Sandoe P. Protecting Animals and Enabling Research in the European Union: An Overview of Development and Implementation of Directive 2010/63/EU. 2016. doi: 10.1093/ilar/ilw029.
- Park G., Rim Y.A., Sohn Y., Nam Y., Ju J.H. Replacing Animal Testing with Stem Cell-Organoids : Advantages and Limitations. 2024. doi: 10.1007/s12015-024-10723-5.
- Parlamento Europeo e Consiglio. Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 276, 20.10.2010, pag. 33-79.

- Patterson-Kane E.G., Harper D.N., Hunt M. The cage preferences of laboratory rats. 2001. doi: 10.1258/0023677011911390.
- Poh W. T. & Stanslas J. The new paradigm in animal testing - "3Rs alternatives". 2024. doi: 10.1016/j.yrtph.2024.105705
- Poole T. Happy animals make good science. 1997 doi: 10.1258/002367797780600198.
- Portfors C.V. Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. 2007. doi: 10.1038/sj.neo.7900340
- Pound P. & Nicol C.J. Retrospective harm benefit analysis of pre-clinical animal research for six treatment interventions. 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0193758.
- Pun S, Haney LC, Barrile R. Modelling Human Physiology on-Chip: Historical Perspectives and Future Directions. 2021. doi: 10.3390/mi12101250.
- Redazione AboutPharma. Sperimentazione animale, gli ultimi dati italiani di utilizzo del 2020 confermano un calo d'uso. AboutPharma. 2023, 13 luglio. <https://www.aboutpharma.com/animal-health/sperimentazione-animale-gli-ultimi-dati-italiani-di-utilizzo-del-2020-confermano-un-calo-duso/>
- Reeb-Whitaker C.K., Paigen B., Beamer W.G., Bronson R.T., Churchill G.A., Schweitzer I.B., Myers D.D. The impact of reduced frequency of cage changes on the health of mice housed in ventilated cages. 2001. doi: 10.1258/0023677011911381
- Roughan J.V. & Flecknell P.A. Pain assessment and control in laboratory animals. 2003. doi: 10.1258/00236770360563831.
- Rovidia C., Barton-Maclaren T., Benfenati E., Caloni F., Chandrasekera P.C., Chesné C., Cronin M.T.D., De Knecht J., Dietrich D.R., Escher S.E., Fitzpatrick S., Flannery B., Herzler M., Hougaard Bennekou S., Hubesch B., Kamp H., Kisitu J., Kleinstreuer N., Kovarich S., Leist M., Maertens A., Nugent K., Pallocca G., Pastor M., Patlewicz G., Pavan M., Piersma A., Rorije E., Schmeits P., Scholz S., Schüttler A., Skanes L., Smedley M., Stucki A., Tralau T., Wedebye E.B., Worth A., Yang C., Zuang V. Internationalization of Read-Across as a Validated New Approach Method (NAM) for Regulatory Toxicology. 2020. doi: 10.14573/altex.1912181
- Runge S., von Zedtwitz S., Maucher A.M., Bruno P., Osbelt L., Zhao B., Gernand A.M., Lesker T.R., Gräwe K., Rogg M., Schell C., Boerries M., Strowig T., Andrieux G., Hild B., Rosshart S.P. Laboratory mice engrafted with natural gut microbiota possess a wildling-like phenotype. 2025. doi: 10.1038/s41467-025-60554-2.

- Russell W.M.S. & Burch R.L. The Principles of Humane Experimental Technique. 1959. London: Methuen.
- Schmeisser S., Miccoli A., von Bergen M., Berggren E., Braeuning A., Busch W., Desaintes C., Gourmelon A., Grafström R., Harrill J., Hartung T., Herzler M., Kass G.E.N., Kleinstreuer N., Leist M., Luijten M., Marx-Stoelting P., Poetz O., van Ravenzway B., Roggeband R., Rogiers V., Roth A., Sanders P., Thomas R.S., Vinggaard A.M., Vinken M., van de Water B., Luch A., Tralau T. New approach methodologies in human regulatory toxicology - Not if, but how and when! Environment International. 2023. doi: 10.1016/j.envint.2023.108082
- Sewell F., Alexander-White C., Brescia S., Currie R.A., Roberts R., Roper C., Vickers C., Westmoreland C., Kimber I. New approach methodologies (NAMs): identifying and overcoming hurdles to accelerated adoption. 2024. doi: 10.1093/toxres/tfae044.
- Soave O., Brand C.D. Coprophagy in animals: a review. 1991.
- Spruijt B.M., van den Bos R., Pijlman F.T. A concept of welfare based on reward evaluating mechanisms in the brain: anticipatory behaviour as an indicator for the state of reward systems. 2001. doi: 10.1016/s0168-1591(00)00204-5.
- Stokes E.L., Flecknell P.A., Richardson C.A. Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures. 2009. doi: 10.1258/la.2008.008020.
- Strech D. & Dirnagl U. 3Rs missing: animal research without scientific value is unethical. 2019. doi:10.1136/bmj-2018-000048
- Swiss 3R Competence Centre. Algorithmic Breeding Planning - Multigeneration Breeding Planner. Swiss 3RCC. 2025.
- Tannenbaum J. & Bennett B. T. Russell and Burch's 3Rs then and now: The need for clarity in definition and purpose. 2015. doi: 10.30802/AALAS-JAALAS-15-000010
- Tecniplast. A sustainable Lab animal Facility for Sustainable research: how to select a green and sustainable supplier. Tecniplast News. 2024.
- The Francis Crick Institute. Genetically altered rodents: Colony management, breeding strategies and genetic quality control. 2024.
- The Jackson Laboratory. Cryopreservation of Transgenic Mice: Protect Valuable Mouse Strains and Reduce Costs. JAX Blog. 2026.
- Ueno H., Takahashi Y., Suemitsu S., Murakami S., Kitamura N., Wani K., Matsumoto Y., Okamoto M., Ishihara T. Effects of repetitive gentle handling of male C57BL/6NCrl mice on comparative behavioural test results. 2020. doi: 10.1038/s41598-020-60530-4.

- University of Lausanne. Treasures in the freezer to limit animal farming for research. 2025.
- Vallée M., Mayo W., Dellu F., Le Moal M., Simon H., Maccari S. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. 1997. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-07-02626.1997.
- Van de Weerd H.A., Van Loo P.L., Baumans V. Environmental enrichment: room for reduction? 2004. doi: 10.1177/026119290403202s14.
- Vargas Mamani J.J. Parámetros bioquímicos y sanguíneos de la rata de laboratorio (*Rattus norvegicus*): revisión de la literatura. 2020. doi:10.33326/26176068.2020.1.927.
- Vargas Mamani J.J. Parámetros fisiológicos y metabólicos de la rata de laboratorio (*Rattus norvegicus*). 2020. doi:10.33326/26176068.2020.2.1016
- Verywell Health. In Vivo vs. In Vitro: Definitions. 2008.
- Vetmeduni Vienna. Precision Livestock Farming Hub (PLF-Hub). University of Veterinary Medicine Vienna. 2025.
- Voelkl B., Altman N.S., Forsman A., Forstmeier W., Gurevitch J., Jaric I., Karp N.A., Kas M.J., Schielzeth H., Van de Castele T., Würbel H.. Reproducibility of animal research in light of biological variation. 2020. doi: 10.1038/s41583-020-0313-3
- von Kortzfleisch V.T. & Richter S.H. Systematic heterogenization revisited: Increasing variation in animal experiments to improve reproducibility? 2024. doi: 10.1016/j.jneumeth.2023.109992.
- Wells S. E. & Bellantuono I. Building for the future: essential infrastructure for rodent ageing studies. 2016. doi: 10.1007/s00335-016-9646-7
- Williams W.R., Lane S.P., Perkins C., Henderson K. Comparison of Plenum and Cage-level Filter Exhaust Dust PCR Testing to Soiled Bedding Sentinel Mice (*Mus musculus*) on an IVC Rack. 2024. doi: 10.30802/AALAS-JAALAS-23-000073
- Würbel H. Behavioral phenotyping enhanced – beyond (environmental) standardization. *Genes, Brain and Behavior*. 2002. doi: 10.1046/j.1601-1848.2002.00006.x
- Würbel H. Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behaviour. 2001. doi: 10.1016/s0166-2236(00)01718-5.
- Zynda J. Sustainability in Laboratory Animal Facilities. In *Proceedings of the IVCs: Delivering the Best Environment for Science, Safety and Animal Welfare Symposium*. Payette Architects. 2014.