



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e
Salute

Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

**Analisi della gestione e del monitoraggio sanitario
di un modello di stabulario: un caso di
contaminazione da *Entamoeba* spp.**

Relatore: Prof. Alessandro Zotti

Correlatore: Dott. Carlo Zatti

Laureanda: Eleonora Zambon

Matricola n. 1204004

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

Indice

PREMESSA	1
RIASSUNTO	3
ABSTRACT	5
INTRODUZIONE	7
1. BASI DELLA SPERIMENTAZIONE ANIMALE	7
1.1 Sperimentazione animale.....	7
1.2 Topo da laboratorio	8
1.3 Normative di riferimento.....	8
1.3.1 Obiezione di coscienza	10
1.4 Organismo Preposto al Benessere degli Animali (OPBA)	11
1.5 Le 3R: <i>Replacement, Reduction, Refinement</i>	11
1.6 Definizioni.....	13
1.6.1 Autorità competente	13
1.6.2 Stabilimento	14
1.6.3 Progetto.....	14
1.6.4 Responsabile del Progetto di Ricerca	14
1.6.5 Procedura.....	14
1.6.6 Membro scientifico	16
1.6.7 Responsabile del Benessere Animale (RBA)	16
1.6.8 Veterinario designato (VD).....	17
2. REQUISITI PER GLI STABILIMENTI E PER LA CURA E LA SISTEMAZIONE DEGLI ANIMALI	20
2.1 Classificazione animali.....	20
2.1.1 Animali Convenzionali (CV)	20
2.1.2 Animali <i>Specific Pathogen Free</i> (SPF).....	20
2.1.3 Animali <i>Germ-Free</i> (GF)	20
2.2 Classificazione strutture.....	21
2.2.1 Stabulario convenzionale	21
2.2.2 Stabulario barrierato	21
2.3 Progettazione dello stabulario	23

2.3.1	Stanze di stabulazione	24
2.3.2	Quarantena.....	24
2.3.3	Flussi di movimentazione	25
2.3.4	Lavaggio, ricevimento e stoccaggio dei materiali	26
2.3.5	Condizioni di stabulazione	28
2.3.6	Procedure di pulizia, sanitizzazione e sterilizzazione	35
2.4	Controlli sanitari e monitoraggio ambientale in stabulario.....	36
2.4.1	<i>Health Monitoring Program</i> (HM).....	37
2.4.2	Unità microbiologica.....	41
2.4.3	Topi sentinella.....	42
2.4.4	Test diagnostici	43
2.4.5	Interventi in caso di contaminazione - <i>Facility Outbreak</i>	47
2.4.6	Importazione, scambio e trasporto di animali	48
2.5	Individuazione e prevenzione dei rischi	50
MATERIALI E METODI.....		62
3.	ANALISI DI UN MODELLO DI STABULARIO UNIVERSITARIO.....	62
3.1	Stabulario Universitario "A"	62
3.2	Stabulario Universitario "B"	67
4.	POSITIVITÀ A <i>Entamoeba</i> spp.	68
4.1	<i>Entamoeba</i> spp.	68
4.2	Indagine microbiologica	71
4.2.1	Ipotesi sulla causa di contaminazione.....	72
5.	PROGRAMMA DI ERADICAZIONE	76
5.1	Preparazione del campione	76
5.2	Estrazione del DNA.....	76
5.3	Amplificazione del controllo interno	77
5.4	Ricerca di <i>Entamoeba</i> spp.....	77
RISULTATI.....		79
DISCUSSIONE E CONCLUSIONE.....		83
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA		92

PREMESSA

Tra le guide che ho utilizzato per l'elaborazione della mia tesi, è stata per me importante la consultazione del *Manuale per la gestione integrata degli stabulari*, pubblicato nella collana *Quaderni de "La Ricerca scientifica"* (n.121) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (Rodinò *et al.*, 2020). Manuali come questo nascono dall'esigenza di raggruppare le Direttive europee in materia di sperimentazione animale e i Decreti Legislativi emanati in attuazione delle Direttive sul territorio nazionale, ai quali fanno riferimento tutti gli stabulari operanti a livello italiano. Il mio lavoro è consistito nello sviscerare il contenuto di tali normative, con l'aiuto delle preziose guide, per fornire un quadro delle operazioni di gestione e monitoraggio di uno stabulario.

Dopodiché, date queste fondamentali premesse, ho potuto analizzare il modello gestionale di un importante stabulario dell'Università di Padova, la cui caratteristica peculiare è il fatto di possedere una certificazione *Specific Pathogen Free* pur trovandosi allo stesso piano di uno stabulario convenzionale, all'interno del quale invece è presente un'ampia gamma di microrganismi. Essi non sono divisi da barriere fisiche, eppure il mantenimento della separazione microbiologica è possibile grazie all'applicazione di rigorose misure di biosicurezza da parte degli operatori.

Ho personalmente potuto accedere alla struttura, dovendo rispettare io stessa le procedure operative standard, osservando le condizioni di stabulazione e la manipolazione degli animali da parte degli operatori.

Nel frattempo, nel corso delle analisi microbiologiche proprie del monitoraggio semestrale dello stabulario, sono state rilevate delle positività a *Entamoeba* spp. Ho partecipato dunque alle indagini riguardanti la causa di contaminazione, la risoluzione della non conformità e la progettazione di un piano di eradicazione. La vastità dell'argomento mi ha costretto a fare delle scelte e preferire l'approfondimento di temi in linea con il mio vissuto e le mie finalità. Ho dovuto così lasciare poco spazio ad aspetti fondamentali nella sperimentazione in sé, con i quali non ho avuto particolarmente a che fare nella mia personale esperienza, per esempio le specie animali diverse dal topo da laboratorio.

Lascio a tutti coloro fossero interessati all'argomento o semplicemente incuriositi la possibilità di approfondire qualunque dubbio consultando la bibliografia.

RIASSUNTO

Lo stabulario è il luogo in cui si allevano o si ospitano gli animali necessari allo svolgimento degli esperimenti. Essi sono per la maggior parte topi.

La sperimentazione animale è regolamentata dalla Direttiva 2010/63/UE, che tutela il benessere degli animali da laboratorio.

Gli stabilimenti devono essere progettati, costruiti, gestiti e monitorati rispettando determinati requisiti. I controlli sanitari devono essere programmati sviluppando un *Health Monitoring Program*.

L'oggetto di osservazione e studio di questa tesi è lo Stabulario Universitario "A". Esso, fino a marzo 2023, era classificato come *Specific Pathogen Free*. La sua particolarità era proprio quella di riuscire a conservare il suo stato sanitario nonostante la sua adiacenza strutturale a uno stabulario convenzionale.

Inizialmente l'obiettivo della tesi era quella di analizzare le procedure di gestione e di monitoraggio sanitario che consentivano di mantenere una separazione microbiologica tra i due stabulari.

Durante le analisi copromicroscopiche semestrali effettuate sui topi sentinella, però, alcuni *Rack* sono risultati positivi a *Entamoeba* spp.

La diagnosi è stata confermata attraverso ulteriori esami copromicroscopici.

La causa di contaminazione è stata identificata con un erraneo utilizzo dell'autoclave durante le operazioni di sterilizzazione dell'acqua, che ha consentito l'ingresso e la mancata eliminazione di *Entamoeba* spp.

L'errore procedurale è stato corretto.

È stato programmato un piano di campionamenti fecali di ogni fila di ciascun *Rack* dello stabulario.

È stata elaborata una PCR per individuare in maniera più rapida ed efficiente le positività, confermate poi con il sequenziamento.

Gli animali positivi sono stati allontanati dalla struttura.

Attualmente, è in programma la realizzazione di PCR sulle feci dei topi sentinella di ciascun *Rack*, per confermare ulteriormente quanto emerso dalle analisi precedenti.

Al prossimo monitoraggio semestrale si avrà la conferma definitiva dell'avvenuta eradicazione di *Entamoeba* spp.

Si è ipotizzato, consultando la letteratura, che il microrganismo in questione fosse *Entamoeba muris* o *Entamoeba coli*. Con le analisi molecolari, però, non è stato possibile identificare la specie con certezza.

ABSTRACT

The animal facility is a place where the experimental animals, mostly mice, are bred or housed.

Animal testing is regulated by the Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

The facilities must be designed, built, managed and monitored in accordance with certain requirements. A Health Monitoring Program should be created in order to organize health checks.

This thesis analyzes the University Enclosure "A".

Until March 2023, this facility was classified as Specific Pathogen Free. Its peculiarity was precisely the fact of being able to preserve its sanitary status despite its structural adjacency to a conventional animal facility.

The aim of this thesis was initially to analyze the sanitary management and the monitoring procedures which allowed to maintain a microbiological separation between the two structures.

However, during the last copromicroscopic analyses, carried out every six months on sentinel mice, some Racks were positive for *Entamoeba* spp.

The diagnosis was confirmed by further copromicroscopic examinations.

The cause of contamination was identified with an erroneous use of the autoclave during water sterilization, which allowed the entry of *Entamoeba* spp. and prevented its elimination.

The procedural error was corrected.

A faecal sampling plan was programmed for each row of each Rack of the animal enclosure.

A PCR was developed to identify positivity more quickly and efficiently. Then, the positivity was confirmed with sequencing.

The positive animals were removed from the facility.

Currently, it is planned to carry out PCRs on sentinel mice of each Rack, to further confirm what emerged from the previous analyses.

The next six-month monitoring will show the definitive confirmation of the successful eradication of *Entamoeba* spp.

It has been hypothesized, consulting the literature, that the microorganism at issue was *Entamoeba muris* or *Entamoeba coli*. However, it was not possible to identify the species with certainty, using molecular analyses.

INTRODUZIONE

1. BASI DELLA SPERIMENTAZIONE ANIMALE

1.1 Sperimentazione animale

La sperimentazione animale è l'impiego di animali vivi a scopo scientifico all'interno di un progetto di ricerca in ambito farmacologico, fisiologico, fisiopatologico, biomedico e biologico. La sperimentazione è necessaria per la valutazione degli effetti di una molecola, di un farmaco, di una pratica medica o di un dispositivo biomedico su un modello, rappresentato appunto dall'animale, prima di poter passare all'essere umano.

Lo stabulario è un locale annesso a istituti o laboratori di ricerca in cui si allevano o si ospitano gli animali oggetto di sperimentazione. L'utilizzo degli animali è ancora in molti casi necessario e previsto dalla legge perché, per esempio, alcuni effetti di una terapia si manifestano solo in organismi completi e non in cellule o tessuti isolati, o perché alcune patologie possono essere sviluppate e osservate solo su esseri viventi.

La sperimentazione animale e la stabulazione sono attività che interessano Università, Istituti del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) e, in generale, centri di ricerca pubblici e privati. Si tratta di pratiche regolamentate dalla Direttiva 2010/63/UE, recepita in Italia dal Decreto Legislativo n. 26 del 2014.

Topi e ratti rappresentano la quasi totalità degli animali stabulati a fini sperimentali. Secondo i dati pubblicati nel 2022 sulla Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana (GURI), l'83% degli animali utilizzati nella sperimentazione in Italia nel 2018 sono stati roditori (462.835 roditori su 557.426 animali); dei roditori, il 73% erano topi (*Mus musculus*) e il 24% ratti (*Rattus norvegicus*). Una fetta importante di animali usati in sperimentazione è rappresentata dai polli domestici (*Gallus gallus domesticus*) con una percentuale del 7,6%. È in costante crescita l'utilizzo dei pesci (in particolare gli zebrafish, *Danio rerio*) che rappresentano il 6,3%.

1.2 Topo da laboratorio

Il topo da laboratorio (*Mus musculus*) è il modello animale più utilizzato per lo studio delle malattie dell'uomo, in quanto di questa specie si conoscono molto bene la genetica, la fisiologia e la biologia dello sviluppo. Esso deriva dal topo domestico: un animale prevalentemente **notturno**, **scavatore** e **arrampicatore**, che costruisce nidi per regolare il microambiente, come rifugio e a fini riproduttivi. I topi in genere non attraversano spazi aperti, ma preferiscono rimanere vicini alle pareti o ad altre strutture.

In funzione della densità di popolazione si è osservata un'ampia gamma di **organizzazioni sociali**.

Nei maschi sessualmente attivi è possibile riscontrare una forte **territorialità**. Le femmine in attesa e in lattazione possono dimostrarsi aggressive per difendere il nido.

I topi, specialmente quelli albini, non hanno una vista particolarmente acuta, per questo si affidano soprattutto all'**olfatto** e marcano l'ambiente in cui vivono con l'urina. I topi hanno anche un **udito** molto sviluppato e sono sensibili agli ultrasuoni. I diversi ceppi presentano differenze nell'espressione e nell'intensità dei comportamenti.

Racc. 2007/526/CE

1.3 Normative di riferimento

Negli ultimi anni si è dimostrato sempre più necessario garantire in parallelo la qualità della ricerca e la cura degli animali da sperimentazione, essendo un livello elevato di benessere vantaggioso sia per gli animali che per la ricerca. Questo, associato a un aumento della sensibilità sia scientifica che popolare a riguardo, ha fatto sì che venissero emanate apposite normative a livello europeo e nazionale sull'organizzazione e la gestione dello stabulario. Sono nati così degli standard internazionali a tutela del benessere animale e delle condizioni di sicurezza degli operatori.

Direttiva 2010/63/UE

(revisione della Direttiva 86/609)

Stabilisce le misure volte a tutelare il benessere degli animali utilizzati a fini scientifici. La Direttiva rappresenta un passo importante del percorso verso

l'obiettivo della completa sostituzione delle procedure su animali vivi a fini scientifici o educativi. Le misure puntano infatti a limitare al minimo la sperimentazione animale e a imporre requisiti per l'utilizzo, la cura e il ricovero degli animali stessi.

Decreto Legislativo n. 26, del 4 marzo 2014

(attuazione della direttiva 2010/63/UE in Italia)

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

Ambito di applicazione del Decreto

Art.1, comma 3; Art. 7; Art. 9 del D. Lgs. 26/2014

- Tutti gli animali vertebrati vivi non umani, comprese le forme larvali autonome e le forme fetali di mammiferi dall'ultimo terzo di gestazione.
- I cefalopodi: una classe di invertebrati dal sistema nervoso particolarmente complesso.
- È soggetto a restrizioni l'uso di primati non umani per la sperimentazione.
- È vietato l'uso di: scimmie antropomorfe (scimpanzé, bonobo, gorilla e oranghi); animali allo stato selvatico; specie in via d'estinzione.

La sperimentazione animale è autorizzata solo per le procedure con tali fini:

Art. 5 del D. Lgs. 26/2014

- La **ricerca di base**;
- La ricerca applicata o **traslazionale** che persegue la prevenzione, la diagnosi o la cura delle **malattie** [...];
- Sviluppo, produzione o prove di qualità, di efficacia e di innocuità dei **farmaci**, dei prodotti alimentari, dei mangimi [...];
- La protezione dell'**ambiente** naturale nell'interesse della salute umana o animale;
- La ricerca finalizzata alla conservazione delle **specie**;
- L'istruzione superiore o la **formazione** professionale;
- Le **indagini** medico-legali.

Valutazione dei progetti implicanti la sperimentazione animale

Art. 31 del D. Lgs. 26/2014

- L'uso di animali a fini sperimentali è consentito nei casi in cui **non esiste un metodo alternativo** soddisfacente.
- I progetti che prevedono di effettuare esperimenti su animali vivi devono essere **valutati** dall'Organismo Preposto al Benessere degli Animali, che poi richiede l'**autorizzazione** al Ministero della Salute (MSAL) tramite invio telematico di un apposito schema per la presentazione di un progetto di ricerca (All. VI del D. Lgs. 26/2014). Tali progetti non possono avere inizio prima di aver ricevuto una valutazione favorevole: l'uso di animali è giustificato se i **benefici** previsti per gli esseri umani, gli animali e l'ambiente **superano** i **danni** (sofferenza, dolore, distress) causati agli animali, tenendo conto di considerazioni di natura etica.
- Il **numero** di animali utilizzati in un progetto deve essere ridotto al **minimo**, senza compromettere gli obiettivi del progetto.
- Le condizioni di vita e i metodi utilizzati nelle procedure devono **evitare** il più possibile il **dolore**, la **sofferenza** o l'**angoscia** negli animali.
- I soggetti che interagiscono con gli animali devono avere una **formazione teorica e pratica** adeguata e le loro competenze devono essere valutate.

Al MSAL competono la **vigilanza** sulla corretta applicazione della **normativa**, il controllo dei **registri** di carico e scarico degli animali, la raccolta dei **dati statistici** sull'utilizzazione degli animali e la loro pubblicazione annuale sulla Gazzetta Ufficiale.

1.3.1 Obiezione di coscienza

In Italia è in vigore la Legge n. 413 del 12 ottobre 1993 che fa riferimento alle norme sull'obiezione di coscienza alla sperimentazione animale.

Secondo l'Art. 1, *"I cittadini che, per obbedienza alla coscienza, nell'esercizio del diritto alle libertà di pensiero, coscienza e religione [...], si oppongono alla violenza su tutti gli esseri viventi, possono dichiarare la propria obiezione di coscienza ad ogni atto connesso con la sperimentazione animale"*.

Secondo l'Art. 3, comma 5, *"Tutte le strutture pubbliche e private legittimate a svolgere sperimentazione animale hanno l'obbligo di rendere noto a tutti i lavoratori e gli studenti il loro diritto ad esercitare l'obiezione di coscienza alla sperimentazione animale. Le*

strutture stesse hanno inoltre l'obbligo di predisporre un modulo per la dichiarazione di obiezione di coscienza alla sperimentazione animale a norma della presente legge”.

1.4 Organismo Preposto al Benessere degli Animali (OPBA)

Con il D. Lgs. 26/2014 è stata imposta a ciascun allevatore, fornitore o utilizzatore di animali ai fini di ricerca la costituzione di un “Organismo Preposto al Benessere degli Animali” (Art. 25). L'OPBA, o *animal-welfare body*, è costituito dal **Responsabile del Benessere Animale (RBA)**, dal **Veterinario Designato (VD)** e da almeno un **Membro Scientifico**.

Il loro lavoro è coadiuvato dal **Comitato nazionale** per la protezione degli animali usati a fini scientifici (Art. 38), istituito presso il MSAL - Direzione Generale della Sanità Animale e dei Farmaci Veterinari. Il Comitato si occupa sia di fornire consulenza alle autorità competenti e agli OPBA, che di favorire lo scambio di informazioni e la condivisione delle *best practices* con i comitati degli altri Paesi dell'UE.

Ruoli dell'OPBA

Art. 26 del D. Lgs. 26/2014

- Fornire **consulenza** al personale dello stabulario su questioni riguardanti il benessere animale;
- Promuovere l'applicazione del principio delle **3R** (*Replacement, Reduction, Refinement*);
- **Informare** sugli sviluppi tecnico-scientifici;
- Promuovere l'**aggiornamento** professionale del personale;
- Occuparsi del monitoraggio, della comunicazione e della verifica del **benessere animale**;
- Seguire lo sviluppo e l'esito dei progetti di **ricerca** considerando gli effetti sugli animali utilizzati; ecc.

1.5 Le 3R: *Replacement, Reduction, Refinement*

Nel 1959, W.M.S. Russell e R.L. Burch hanno pubblicato il principio de “le tre R”: una strategia pratica di sostituzione, riduzione e perfezionamento. Questo approccio è stato accettato a livello internazionale nel corso degli anni e i

ricercatori lo applicano, quando considerano la progettazione sperimentale, nella ricerca sugli animali da laboratorio.

Secondo la guida "Guide for the care and use of laboratory animals" (2011), commissionata dal National Research Council degli USA:

Sostituzione

La sostituzione è l'utilizzo di metodi alternativi alla sperimentazione su animali. Una sostituzione **assoluta** di tipo **biologico** prevede il rimpiazzo degli animali con materiale biologico come colture cellulari, organi isolati, tessuti, ecc. Una sostituzione **assoluta** di tipo **non biologico** utilizza sistemi inanimati come la bioinformatica, la statistica, ecc. In una sostituzione **relativa** sono utilizzati animali appartenenti a un livello inferiore della scala filogenetica.

I metodi alternativi possono essere attuati solo dopo un processo di validazione e approvazione attraverso un preciso *iter*, da quando nel 2011 il MSAL ha istituito il "Centro di Referenza Nazionale per Metodi Alternativi, Benessere e Cura degli Animali da Laboratorio", presso l'Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia-Romagna (IZSLER). L'IZSLER è in contatto con l'"European Centre for the Validation of Alternative Methods" (ECVAM, 1991).

Un notevole impulso allo sviluppo di metodi alternativi a livello europeo è venuto dal Reg. (CE) 1223/2009, il quale ha vietato l'immissione sul mercato di cosmetici sperimentati sugli animali o contenenti ingredienti testati su animali.

Riduzione

La riduzione è l'utilizzo di metodi che consentono di ottenere livelli comparabili di informazioni dall'uso di un **minor numero** di animali o livelli maggiori di informazioni dallo stesso numero di animali (senza aumentare il dolore o l'angoscia) in modo che nel lungo periodo siano necessari meno animali per acquisire le stesse informazioni scientifiche. È indispensabile progettare accuratamente l'esperimento rispetto agli obiettivi che si vogliono raggiungere (compresi i metodi di campionamento), studiare scrupolosamente la letteratura, utilizzare i dati esistenti, effettuare un'accurata analisi statistica al fine di individuare il corretto numero di animali da utilizzare.

Perfezionamento

Il perfezionamento è la revisione delle procedure di allevamento e/o sperimentali ai fini di **migliorare** il **benessere** degli animali e **ridurre** al minimo o eliminare il **dolore** e l'angoscia. Uno IACUC (*Institutional Animal Care and Use Committee*), nell'analisi di un progetto di ricerca, deve ipotizzare il manifestarsi di risultati sperimentali imprevisti o previsti che producono dolore - responsabilità che in Italia spetta all'OPBA.

I progressi scientifici e tecnologici in campo **anestesiologico** possono essere considerati come un aspetto essenziale nel *Refinement*.

Rodinò et al., 2020; Buchanan-Smith et al., 2005.

1.6 Definizioni

1.6.1 Autorità competente

“Il Ministero della salute, le regioni, le province autonome di Trento e Bolzano, i comuni, le aziende sanitarie locali secondo gli ambiti di rispettiva competenza”

Art. 3 del D. Lgs. 26/2014

Il **Comune** è l'autorità competente per il rilascio dell'**autorizzazione**, la sospensione o la revoca dell'esercizio per gli stabilimenti **allevatori** o **fornitori** degli animali destinati alla ricerca scientifica.

Il **MSAL** è l'autorità competente per il rilascio dell'**autorizzazione** per la sospensione o la revoca dell'esercizio per gli stabilimenti **utilizzatori**, in cui gli animali vengono stabulati per essere utilizzati nella sperimentazione scientifica (Art. 4, comma 3 del D. Lgs. 26/2014).

Per tutte le tipologie di stabilimento l'autorizzazione rilasciata dall'autorità competente ha una durata massima di 6 anni (Art. 20, comma 5 del D. Lgs. 26/2014).

Le autorità competenti effettuano **ispezioni** regolari sugli allevatori, sui fornitori e sugli utilizzatori e i rispettivi stabilimenti, nonché sull'esecuzione dei progetti per verificare la conformità degli stessi con i requisiti del Decreto e dell'autorizzazione rilasciata. La frequenza delle ispezioni dipende dai rischi di ciascuno stabilimento. In ogni caso, almeno un terzo degli stabilimenti di utilizzatori sono controllati ogni anno e una parte di tali ispezioni viene effettuata senza preavviso.

1.6.2 Stabilimento

“Qualsiasi impianto, edificio, gruppo di edifici o altri locali in cui sono allevati, sono tenuti o sono utilizzati animali alle finalità del presente decreto; può comprendere anche un luogo non completamente chiuso o coperto e strutture mobili.”

Art. 3 del D. Lgs. 26/2014

1.6.3 Progetto

“Un programma di lavoro con un preciso obiettivo scientifico che prevede il ricorso a una o più procedure [...]”

Art. 3 del D. Lgs. 26/2014

1.6.4 Responsabile del Progetto di Ricerca

“La persona fisica titolare dell’autorizzazione del progetto, che provvede all’elaborazione delle procedure e di progetti ed è responsabile degli aspetti amministrativi e scientifici.”

Art. 3 del D. Lgs. 26/2014

Il Responsabile del Progetto di Ricerca deve elaborare la documentazione relativa alla presentazione dei progetti di ricerca al MSAL, i quali dovranno essere sottoscritti anche dal VD e dall’RBA, e nominare l’eventuale Responsabile dell’Esecuzione degli Esperimenti (se non li dovesse eseguire lui stesso).

1.6.5 Procedura

*“Qualsiasi uso, invasivo o non invasivo, di un animale ai fini sperimentali o ad altri fini scientifici [...] o ai fini educativi, che possa causare all’animale un livello di **dolore**, sofferenza, distress, danno prolungato **equivalente** o **superiore** a quello provocato dall’**inserimento** di un **ago** secondo le buone prassi veterinarie. Ciò include qualsiasi azione che intende o può determinare la nascita o la schiusa di un animale o la creazione e il mantenimento di una linea di animali geneticamente modificata con fenotipo sofferente in queste condizioni. È esclusa dalla definizione la soppressione di animali con il solo fine di impiegarne gli organi o i tessuti.”*

Il **distress** è inteso come una “condizione di non adattamento dell’animale a stimoli stressanti”.

Art. 3 del D. Lgs. 26/2014

Le procedure autorizzate sono solo quelle che sono state ammesse nel quadro del progetto autorizzato.

Esse sono classificate secondo il loro livello di gravità:

1) **Non risveglio:** *“procedure condotte interamente in anestesia generale da cui l'animale non può riprendere coscienza”.*

2) **Lievi:** *“procedure che causano dolore, sofferenza o angoscia lievi e di breve durata, nonché le procedure che non provocano un significativo deterioramento del benessere o delle condizioni generali degli animali”.*

Esempi: somministrazione di anestesia; tecnica non invasiva per immagini; biopsie; somministrazioni SC, IM, IV di sostanze con effetto lieve o nullo; ecc.

3) **Moderate:** *“procedure che causano dolore, sofferenza o angoscia moderati e di breve durata oppure lievi e di lunga durata, nonché le procedure che provocano un deterioramento moderato del benessere o delle condizioni generali degli animali”.*

Esempi: applicazione frequente di sostanze di prova che producono effetti clinici moderati e prelievo di campioni ematici (>10% del volume circolante); chirurgia in anestesia generale e somministrazione di analgesici associata a dolore moderato (...); modelli di induzione di tumori che si prevede causino dolore moderato (...); ecc.

4) **Gravi:** *“procedure che causano dolore, sofferenza o angoscia intensi oppure moderati e di lunga durata, nonché le procedure che provocano un deterioramento grave del benessere o delle condizioni generali degli animali”.*

Esempi: prove di tossicità in cui la morte è il punto finale; chirurgia in anestesia generale e somministrazione di analgesici associata a dolore intenso (...); modelli di induzione di tumori che si prevede causino dolore intenso (...); ecc.

Art. 15 e All. VII del D. Lgs. 26/2014

Il dolore, la sofferenza e i danni durevoli possono influenzare gli esperimenti direttamente, agendo sul sistema nervoso centrale e inducendo risposte fisiologiche (es. aumento di temperatura e pressione arteriosa) e indirettamente, se venissero somministrati antidolorifici (che riducono l'entità delle risposte fisiologiche).

Dunque, oltre che per ragioni etiche, il dolore andrebbe limitato quanto possibile perché potrebbe invalidare il progetto di ricerca, rendendo il modello animale prescelto non più idoneo.

Al termine di una procedura, il VD o una persona competente deve decidere se l'animale può essere mantenuto in vita o meno. Prima di riutilizzare un animale in una nuova procedura, si deve tenere conto della **gravità** effettiva delle **procedure combinate**, della **salute dell'animale** e del **parere del VD**.

1.6.6 Membro scientifico

“Ricercatore o scienziato tecnico e teorico nei vari campi di indagine tecnico-scientifica che, appartenendo alla comunità scientifica, comunica i risultati dei propri lavori attraverso pubblicazioni.”

Art. 3 del D. Lgs. 26/2014

1.6.7 Responsabile del Benessere Animale (RBA)

“La persona responsabile del benessere e dell'assistenza degli animali e del funzionamento delle attrezzature di uno o più stabilimenti.”

Art. 3 del D. Lgs. 26/2014

L'RBA è responsabile della **sistemazione** e della **cura** degli animali.

Art. 22, comma 3 del D. Lgs. 26/2014

All'RBA competono tutti gli aspetti inerenti alla **gestione** e all'**organizzazione** dello **stabulario**, quali:

- **Indicare** le **condizioni** sociali, ambientali e sanitarie che garantiscano il benessere psico-fisico degli **animali** stabulati; definire e rivedere le **Procedure Operative Standard (SOP)** per le attività di pulizia, sanitizzazione e stabulazione e di cura degli animali;
- **Vigilare** sull'applicazione delle **norme** connesse alla stabulazione e alla sperimentazione, sull'operato del personale e sul corretto svolgimento dei compiti attribuiti al VD;
- **Consigliare** il personale nell'applicazione del principio delle **3R**;
- Promuovere e curare l'aggiornamento e la **formazione** del personale, facendo riferimento al Decreto del Ministero della Salute 5 agosto 2021;
- **Controllare** la compilazione e trasmissione dei **progetti** di ricerca attraverso la piattaforma telematica ministeriale “Banca Dati Nazionale della Sperimentazione Animale (BDNS)”, sottoscrivendoli e seguendo poi il loro sviluppo ed esito tenendo conto degli effetti sugli animali e fornendo consulenze;

- Provvedere affinché siano rispettate e salvaguardate le condizioni **igieniche** e la **salute del personale**;
- Comunicare al MSAL i **dati statistici** sull'utilizzazione di animali a fini sperimentali;
- Curare la corretta compilazione dei **registri di carico e scarico** degli animali.

Art. 26 del D. Lgs. 26/2014

1.6.8 Veterinario designato (VD)

“Ciascun allevatore, fornitore o utilizzatore deve disporre di un medico veterinario designato, esperto in medicina degli animali da laboratorio, in possesso di requisiti di esperienza e di formazione specifica, che prescrive le modalità per il benessere e il trattamento terapeutico degli animali.”

Art. 24 del D. Lgs. 26/2014

Il VD può essere un dipendente della struttura oppure un libero professionista. Esso deve in particolare:

- Controllare il **benessere** e le condizioni di **salute** degli **animali**;
- Fornire all'RBA la propria **assistenza veterinaria** e la propria **consulenza** per garantire il benessere degli animali;
- Eseguire periodiche **ispezioni** al fine di verificare le condizioni di stabulazione degli animali;
- **Controllare** la buona esecuzione delle **procedure** e decidere eventualmente di proseguire con l'**eutanasia**;
- Verificare il **protocollo sperimentale**, sottoscrivendolo.

Non è necessaria la presenza costante del VD durante le procedure che non prevedono l'utilizzo di tecniche a rischio per il benessere animale e la cui esecuzione è realizzata secondo prassi di laboratorio consolidate. La valutazione di tali rischi è, in ogni caso, a discrezione del VD.

Quando permangono condizioni di sofferenza insostenibili, si procede immediatamente alla soppressione dell'animale con metodi umanitari sotto la responsabilità del VD (Art. 4 del D. Lgs. 26/2014).

Anestesia

È responsabilità del VD valutare la necessità di pratiche quali la sedazione, l'analgesia e l'anestesia prima, durante e dopo lo svolgimento delle procedure sugli animali.

L'anestesia porta l'animale a uno stato di insensibilità temporaneo e reversibile, caratterizzato da notevole depressione dello stato del sensorio e di quello motorio. Può provocare sia la perdita della sensibilità di una regione anatomica determinata (**a. locale e regionale**), sia della coscienza (**a. generale**).

Le procedure devono avvenire in anestesia, a meno che questa non sia più traumatica per l'animale rispetto alle procedure stesse, oppure se risulta essere incompatibile con le finalità di alcune procedure, come quelle che riguardano le osservazioni del comportamento o la sperimentazione di anestetici e analgesici (Art. 14 del D. Lgs. 26/2014).

Eutanasia

Gli animali possono essere sottoposti a eutanasia se non dovessero essere più necessari alla sperimentazione (*experimental end-point*), o quando permangano condizioni di dolore, sofferenza, distress o danno prolungato moderati o intensi (*humane end-point*). Gli animali possono essere sacrificati anche per scopi scientifici quali la raccolta di organi e tessuti o analisi istopatologiche. Il metodo applicato deve essere **etico, umanitario, affidabile, rapido ed efficace**. I metodi di soppressione sono indicati nell'Allegato IV del D. Lgs. 26/2014 e possono essere praticati solo dal personale con le competenze richieste, a prescindere dalla facilità di esecuzione (DM 5 agosto 2021).

L'eutanasia può avvenire con metodi **farmaco-chimici** (es. CO; CO₂; overdose di anestetico; ecc.) o metodi **meccanici** (es. dislocazione cervicale; decapitazione; ecc.).

La conferma della morte deve avvenire tramite la valutazione della perdita delle funzioni vitali.

Il metodo di elezione sarebbe l'utilizzo del **CO**, poiché consente di praticare una rapida e sicura eutanasia, se utilizzato propriamente, non provocando segni di sofferenza negli animali. Essendo però estremamente pericoloso anche per l'uomo, necessita di attrezzature non sempre disponibili per la gestione del rischio.

Uno dei metodi più utilizzati è dunque l'impiego della **CO₂**, contenuta in una bombola connessa a contenitori appositi dotati di manometro. Sia la saturazione preventiva della camera che il riempimento con concentrazioni crescenti possono causare problemi di benessere. Se si utilizza gas composto al 100% da CO₂ a una portata del 20% del volume della camera per minuto, si è dimostrata perdita di coscienza senza evidenza di dolore, ma pur sempre con manifestazioni di dispnea (Hawkins et al., 2006).

I **neonati** sono particolarmente **resistenti** all'**ipossia** indotta dalla CO₂, per questo vanno preferiti altri metodi come quelli meccanici (Hickman, 2023).

2. REQUISITI PER GLI STABILIMENTI E PER LA CURA E LA SISTEMAZIONE DEGLI ANIMALI

Uno stabulario è un edificio che ospita animali vivi, dunque è destinato a funzionare senza interruzione 24 ore al giorno, inclusi i festivi. Per garantire la corretta stabulazione degli animali e le condizioni di sicurezza nel lavoro per gli operatori è necessario che l'edificio sia ben progettato, ben costruito e riceva una costante manutenzione e pulizia. Sono necessari, dunque, frequenti controlli agli impianti e soluzioni programmate di emergenza che gestiscano guasti e malfunzionamenti improvvisi. I requisiti per gli stabilimenti e per la cura e la sistemazione degli animali sono descritti nell'Allegato III del D. Lgs. 26/2014.

2.1 Classificazione animali

Gli animali da laboratorio, in base alle loro caratteristiche microbiologiche, sono classificati in tre principali categorie:

2.1.1 Animali Convenzionali (CV)

Vi possiamo trovare l'intero *range* di microrganismi infettivi.

2.1.2 Animali *Specific Pathogen Free* (SPF)

Sicuramente privi di uno o più microrganismi stabiliti dalla comunità scientifica.

Es. animali *Specific and Opportunistic Pathogen Free* (SOPF): privi anche dei microrganismi opportunisti.

2.1.3 Animali *Germ-Free* (GF)

Ottenuti mediante riderivazione, sono privi di ogni microrganismo individuabile.

In funzione della tipologia sanitaria degli animali che ospitano, gli stabulari devono rispondere a criteri di gestione ed essere dotati di attrezzature diversificate. Le società internazionali che si occupano della scienza degli animali da laboratorio (FELASA in Europa, AALAS in USA) forniscono nelle loro linee guida una lista di agenti patogeni da ricercare nelle colonie animali (vedi cap. 2.4.1).

2.2 Classificazione strutture

2.2.1 Stabulario convenzionale

È la struttura più diffusa: stabula gli animali **Convenzionali**.

Non prevede l'utilizzo di procedure di accesso e di lavoro estremamente rigorose, ma si devono comunque garantire un buon livello sanitario e la tutela del benessere animale.

Gli utilizzatori possono entrare a diretto contatto con gli animali e i materiali non subiscono particolari processi di sanitizzazione. È sufficiente prevedere una buona pulizia delle attrezzature e dei locali e corrette procedure di lavoro. In queste strutture si possono allevare elevate quantità di animali con spese contenute.

2.2.2 Stabulario barrierato

Stabula animali *Germ-Free* e *Specific Pathogen Free*.

Gli animali devono essere protetti al massimo dal rischio di contaminazioni da microrganismi patogeni, per questo lo stabulario barrierato prevede **regole di accesso** e di **utilizzo** più severe rispetto a quello convenzionale.

Il **personale addetto** deve essere esperto e rispettare procedure di lavoro rigorose.

Tutti i **materiali**, compresi cibo e acqua, devono subire processi di **sterilizzazione** prima di entrare in contatto con gli animali.

Per quanto riguarda gli animali *Germ-Free* è previsto un livello di contenimento sanitario superiore. Gli animali sono stabulati all'interno di **isolatori**, strutture che funzionano come una barriera fisica assoluta che impedisce qualsiasi contatto dell'animale con l'esterno. Negli isolatori si possono allevare anche animali "**a flora definita**", che sono animali originati mediante riderivazione in cui sono stati inoculati pochi e ben definiti batteri (generalmente in numero inferiore a 12).

In questa struttura si possono allevare elevate quantità di animali SPF, ma a costi elevati, data la qualità sanitaria. Per quanto riguarda gli animali GF, ai costi elevati si affianca una gestione complessa: per questo si tende a limitare il numero di animali da allevare.

Esistono anche le **strutture di contenimento**, che sono costruite e gestite per proteggere gli addetti e l'ambiente esterno dai rischi connessi alla sperimentazione.

Infine, possiamo avere **strutture miste** (es. stabulari barrierati con un'area convenzionale o viceversa), nelle quali sono previste procedure di lavoro e attrezzature diversificate, oltre che una zona di separazione che limiti il passaggio da un'area all'altra.

Le strutture barrierate sono utili anche per proteggere animali immunodepressi e geneticamente modificati.



Figura 1: Stanza di stabulazione, Rack con IVC. Rodinò et al., 2020.



Figura 2: Rack con gabbie con filtro in panno. Rodinò et al., 2020.

2.3 Progettazione dello stabulario

Come osservato nel “Manuale per la gestione integrata degli stabulari” (Rodinò *et al.*, 2020), la localizzazione, il progetto e l’organizzazione di uno stabulario dipendono dagli scopi delle attività di ricerca che un Ente si prefigge e dal numero e dalle specie animali che si vuole ospitare. Per esempio: specie tra loro incompatibili, come predatori e prede, non possono essere fatte coabitare nello stesso locale. Non sempre però si conoscono questi aspetti in anticipo, anche perché la ricerca stessa è un’attività imprevedibile, in rapida e progressiva evoluzione: è necessario per questo tenere in considerazione eventuali ampliamenti degli spazi e delle attività nella progettazione di uno stabulario per facilitarne la modifica in tempi rapidi in caso di necessità.

Le diverse figure professionali coinvolte nella realizzazione del progetto devono collaborare alla realizzazione del miglior compromesso tecnico-strutturale.

Lo stabulario può essere realizzato *ex novo* o **ristrutturando** ambienti già esistenti. Nel secondo caso bisogna adeguare il progetto alle caratteristiche degli ambienti esistenti, applicando procedure di lavoro che compensino la presenza di vincoli strutturali.

Uno stabulario può essere **centralizzato** o **decentralizzato**: gli animali, i laboratori e le aree di servizio possono essere adiacenti o meno.

La progettazione di uno stabulario deve prevedere:

- Aree di **stabulazione** degli animali, compresa la **quarantena**;
- **Corridoi, prestanze, interblocchi**;
- Aree dove **lavare, sanitzare e sterilizzare** le attrezzature;
- Aree di **ricevimento e stoccaggio** materiali (mangime, segatura, attrezzature, ecc.);
- Aree attrezzate per il contenimento dei **rifiuti speciali** prima dello smaltimento;
- **Laboratori** specializzati (diagnostica, chirurgia, necroscopia, radiografie, attività sperimentali, ecc.);
- **Spogliatoi, bagni e docce** per il personale tecnico;
- **Uffici** per il personale tecnico;
- **Doppia porta** di accesso allo stabulario e impianto per il controllo degli accessi alle strutture.

2.3.1 Stanze di stabulazione

Le stanze di stabulazione degli animali devono avere delle **dimensioni adatte** alle specie ospitate, alla tipologia di attrezzature impiegate e alla frequenza di movimentazione di materiale e personale.

I locali devono garantire una rapida ed efficiente pulizia e sanitizzazione, perciò devono essere dotati di mura, soffitti e pavimenti **lisci, impermeabili e non scivolosi**. Devono essere costruiti con materiali **resistenti** all'acqua, alle alte temperature e all'uso di detergenti e disinfettanti; devono essere a tenuta d'aria, isolabili e quindi sterilizzabili. Il pavimento deve sopportare il peso di installazioni pesanti e i suoi punti di giunzione con le pareti devono essere ridotti al minimo; inoltre, dovrebbe avere una pendenza che assicuri una rapida rimozione dell'acqua.

Deve essere **impedito l'accesso** ad **animali** indesiderabili.

Le porte devono consentire il passaggio delle attrezzature e devono possedere una **finestrella** che permetta **ispezioni** dall'esterno.

È buona norma posizionare dei **tappeti adesivi** in prossimità delle porte dello stabulario per diminuire la possibilità di introdurre patogeni attraverso le scarpe sporche.

L'**impianto elettrico**, la **linea idrica**, il sistema di **condizionamento**, ecc. dovrebbero essere progettati in modo tale che il personale tecnico possa ispezionarli direttamente, senza dover accedere alle stanze di stabulazione.

Gli animali per uso sperimentale necessitano di **condizioni ambientali standard**: bisogna regolare temperatura, pressione, luce e umidità in tutte le stanze di stabulazione. Per questo motivo, non dovrebbero essere presenti lucernai e finestre.

2.3.2 Quarantena

La quarantena è una combinazione di spazio fisico, sistema di stabulazione e procedure per garantire il contenimento e l'isolamento degli animali in ingresso nello stabulario, soprattutto quelli importati da fonti identificate come potenzialmente rischiose per la salute delle colonie esistenti. Essa è finalizzata a minimizzare l'ingresso di patogeni di cui potrebbero essere portatori o infetti i nuovi animali. Idealmente, ma non necessariamente, la quarantena è fisicamente separata dalle principali stanze di stabulazione delle colonie (vedi gli standard

per il contenimento del rischio biologico presso BSL-2 sviluppati da [CDC-NIH, 2009](#)).

Il tempo di quarantena viene stabilito sulla base dei *report* sanitari che accompagnano gli animali introdotti in stabulario.

2.3.3 Flussi di movimentazione

I flussi di lavoro e i percorsi dei materiali e delle attrezzature, per motivi sanitari, devono sempre essere diretti da un'area "pulita" verso un'area "sporca".

I corridoi che connettono le stanze di stabulazione alle zone dedicate ai servizi devono avere una larghezza che consenta il movimento del personale e delle attrezzature.

- I **corridoi singoli** prevedono flussi in entrambe le direzioni, con maggiori rischi sanitari a causa del passaggio di materiali sporchi e puliti nello stesso luogo, rendendo necessarie delle procedure di lavoro estremamente rigorose.

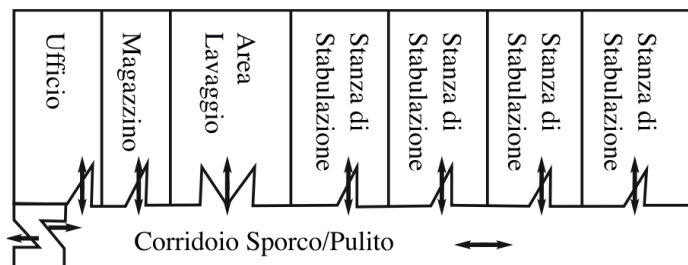


Figura 3: Schema di stabulario con corridoio singolo. *Rodinò et al., 2020*.

- I **corridoi multipli** prevedono un flusso unidirezionale, con minor congestione e minimizzazione del pericolo di contaminazione incrociata.

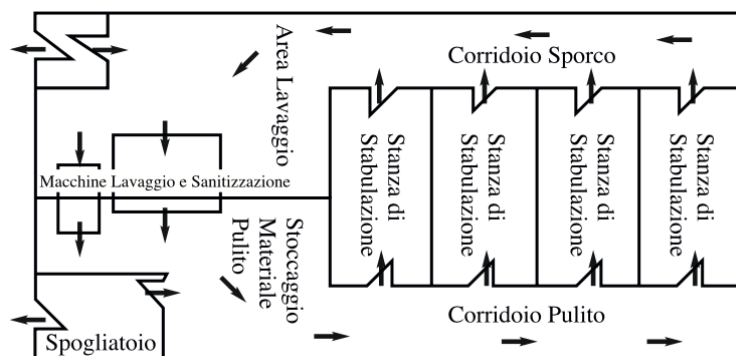


Figura 4: Schema di stabulario con corridoi distinti "sporco" e "pulito".

Rodinò et al., 2020.

Fra due corridoi in successione, che corrispondono ad aree sanitarie diverse, possono essere presenti degli **interblocchi**.

Le stanze di stabulazione possono avere delle **prestanze**, usate eventualmente come aree di preparazione del materiale in ingresso nelle stanze di stabulazione.

Gli interblocchi e le prestanze sono sistemi che consentono di ridurre il rischio di diffusione di patogeni, contaminanti, allergeni e la rumorosità.

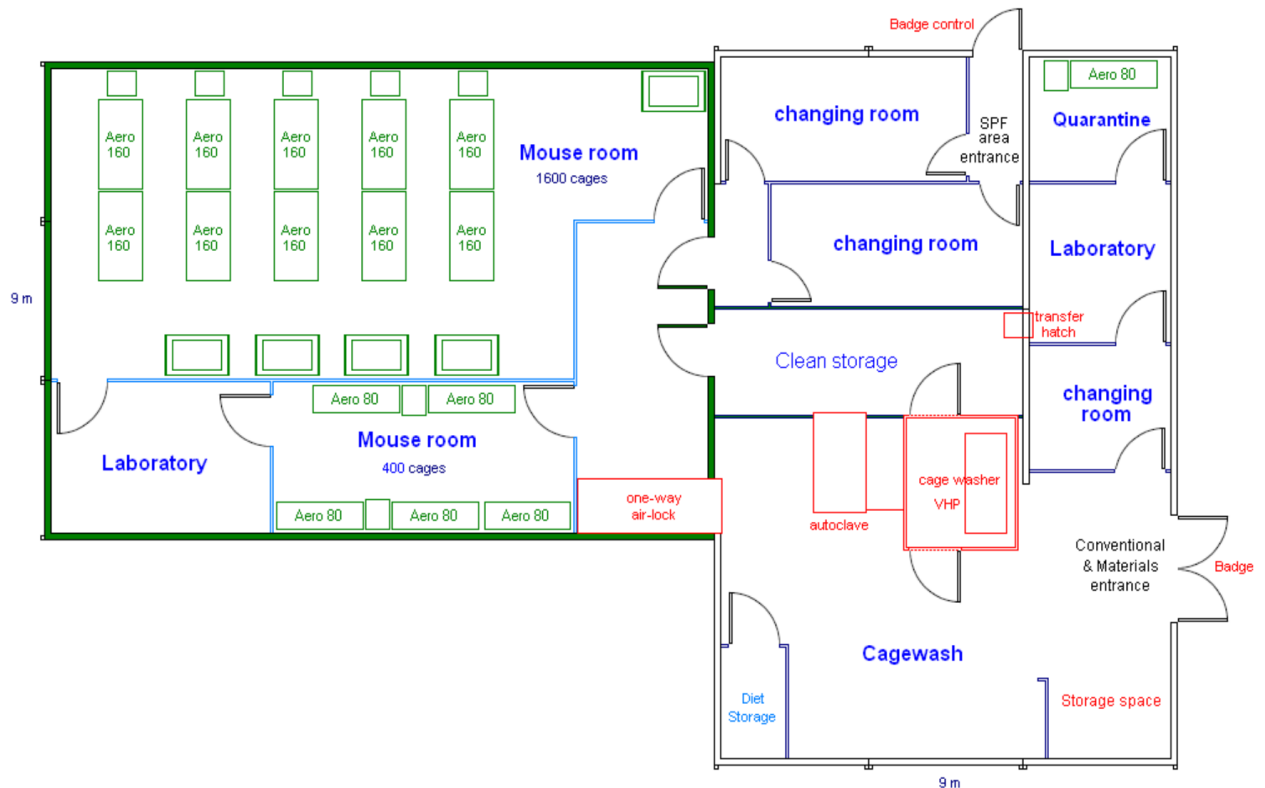


Figura 5: Esempio di Layout di stabulario. *Charles River, 2018.*

2.3.4 Lavaggio, ricevimento e stoccaggio dei materiali

L'area dove avvengono il lavaggio, la sanitizzazione e la preparazione delle gabbie ha una funzione strategica all'interno di uno stabulario, soprattutto se questo ospita un gran numero di animali. È fondamentale garantire una netta separazione tra le attività "pulite" e quelle "sporche", in modo tale da prevenire la trasmissione di patogeni agli animali.

Le gabbie, le bottiglie di abbeverazione e le altre attrezzature sono in genere lavate in lavagabbie o a mano. Tali oggetti sono poi sterilizzati in autoclave, che può essere dotata di una **doppia porta** interbloccante: da un lato (area "sporca") viene inserito il materiale usato che, lavato e sterilizzato, uscirà dal lato opposto (area "pulita"). La separazione è dunque fisica, e può essere rafforzata dalla

presenza di un gradiente di pressione che mantenga la zona “pulita” con una pressione positiva rispetto a quella “sporca”.

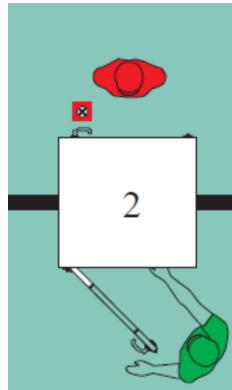


Figura 6: Utilizzo dell'autoclave a doppia porta. *Charles River, 2018.*

Le autoclavi sono utilizzate per sterilizzare:

1. Materiale e strumenti da **riutilizzare** (pinze; vetreria; ecc.);
2. Materiale e liquidi per preparazioni **sterili** (biologia molecolare; colture cellulari; ecc.);
3. Materiale per la **stabulazione** (gabbie; lettiera; mangimi; bottiglie; scaffali; ecc.);
4. **Rifiuti** infetti.

Le **dimensioni** della zona di lavaggio devono essere proporzionali al quantitativo di attrezzature lavate quotidianamente. Nella zona “pulita” deve essere presente uno spazio adeguato a immagazzinare il materiale lavato, in attesa del suo utilizzo. Se le dimensioni di questo spazio non sono adeguate, c'è il rischio che si realizzino delle pratiche scorrette, come quella di appoggiare attrezzature lungo i corridoi di servizio, i quali devono essere tenuti sgombri per motivi di sicurezza e per facilitare la movimentazione di personale e attrezzature. Gli spazi di stoccaggio devono consentire anche una separazione tra prodotti potenzialmente tossici (es. quelli per le pulizie) e quelli destinati agli animali (es. mangime, lettiera).

Nei **magazzini** bisognerebbe garantire un adeguato ricambio d'aria per la conservazione dei prodotti deperibili. Essi devono trovarsi in prossimità dell'area di ricevimento merci: un'area spaziosa, protetta da tettoie e progettata in modo da permettere operazioni di scarico facili e sicure, con rampe di accesso poco pendenti, non sdruciolevoli e sufficientemente larghe.

2.3.5 Condizioni di stabulazione

Nell'Allegato III del D. Lgs. 26/2014 e nelle Raccomandazioni Europee 2007/526/CE sono definite le regole di stabulazione degli animali da laboratorio. Gli animali devono essere adeguatamente trattati senza subire inutili dolori, sofferenza, angoscia e danni durevoli. Tutti coloro che si occupano degli animali dovrebbero ricevere adeguate istruzioni e **formazione**, in modo da acquisire una conoscenza delle caratteristiche biologiche delle specie stabulate e rispettare i loro bisogni fisiologici e comportamentali (DM 5 agosto 2021). La gestione degli **accoppiamenti** è seguita dal personale tecnico e si basa sulla necessità dei singoli gruppi di ricerca di avere a disposizione precisi gruppi di animali in determinati momenti. Una **manipolazione** umanitaria e in sicurezza aiuta a ridurre lo stress, sia per gli animali che per il personale.

Se gli animali sono utilizzati a fini di riproduzione o per procedure scientifiche, è necessario poterli **identificare**, in modo da compilare in maniera precisa i registri. Il metodo scelto deve essere affidabile e causare la minima sofferenza e perturbazione all'animale, sia nel momento in cui viene applicato che sul lungo periodo. Se necessario, è opportuno utilizzare sedativi o anestetici e analgesici locali. Il personale deve essere formato sulle tecniche di identificazione e marcatura.

Ventilazione - Temperatura - Umidità - Pressione

La circolazione dell'aria, i livelli di polvere e la concentrazione di gas devono essere mantenuti entro limiti non nocivi per gli animali.

L'**aria** va rinnovata costantemente, si consigliano **15-20 r/h** (ricambi d'aria all'ora).

Lo stabulario può essere dotato di *Individually Ventilated Cages (IVC)*, ovvero un sistema di filtrazione dell'aria che viene immessa all'interno di ciascuna gabbia, una volta posizionata nel proprio *Rack*. In ambienti come gli IVC o gli isolatori, già ventilati al loro interno con 50-100 r/h, sono sufficienti **8-10 r/h**.

La velocità dell'aria misurata a un'altezza di 1,8 m in una stanza dovrebbe essere inferiore a **0,25 m/s**, specialmente se sono presenti gabbie senza coperchi con panno filtro.

Il sistema di ventilazione dovrebbe fornire un gradiente di **pressione differenziale** tra i vari locali di uno stabulario, affinché le aree che devono essere protette da patogeni aerogeni e contaminanti abbiano una pressione maggiore di

quella degli ambienti circostanti. Per esempio, in uno stabulario di allevamento la pressione nelle stanze di stabulazione sarà maggiore della pressione nei corridoi. Nella quarantena bisognerà applicare il principio inverso, in modo che in questa stanza il flusso dell'aria vada dall'esterno verso l'interno ed eviti la fuoriuscita di eventuali patogeni. Allo stesso modo, in tutti gli stabulari in cui sono gli operatori a dover essere protetti dai patogeni che potenzialmente infettano gli animali la pressione deve essere mantenuta negativa all'interno delle gabbie.

Per i roditori, la temperatura ottimale è di **20-24°C** e l'umidità deve essere mantenuta tra il **45** e il **65%**.

L'impianto di climatizzazione deve garantire condizioni di benessere sia per l'operatore che per gli animali, riducendo la possibilità di contaminazione per via aerea. Nei locali di pulitura e lavaggio, l'impianto di ventilazione deve essere in grado di eliminare calore e umidità eccessivi.

Sono necessari interventi di manutenzione programmata associati a valutazioni periodiche dei parametri microclimatici. Si deve prevedere un'alimentazione di emergenza dell'impianto che si attivi in caso di *blackout* elettrico.

Filtri HEPA

I filtri *High Efficiency Particulate Air* (HEPA) filtrano con efficienza almeno il 99,97% delle particelle con diametro di 0.3 μm , considerando che tale misura rappresenta la dimensione delle particelle che penetrano con più facilità (United States Environmental Protection Agency, 2023). I filtri HEPA si basano su meccanismi di intercettazione, impatto e diffusione delle particelle.

Questo sistema può integrare la filtrazione fornita dal sistema *Heating, Ventilation and Air Conditioning* (HVAC) dei ventilatori di alimentazione delle gabbie. I filtri HEPA possono essere impiegati nelle *Bio Safety Cabinets* (BSC), ovvero le cappe utilizzate durante il cambio delle gabbie e la manipolazione degli animali (Lipman et al., 2015).

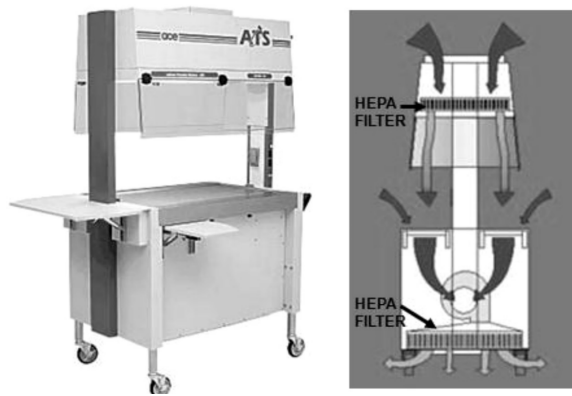


Figura 7: Stazione di cambio a flusso laminare verticale (a sinistra). L'aria filtrata HEPA è diretta verso la superficie di lavoro, in gran parte viene catturata e filtrata tramite HEPA prima di essere rilasciata nella stanza (a destra). *Allentown Caging Co., Inc.*



Figura 8: Cappa a flusso laminare verticale con filtro HEPA. *Polo Multifunzionale A. Vallisneri, Università degli Studi di Padova.*

Illuminazione

L'illuminazione e la sua intensità possono avere effetti sulla fisiologia e sul comportamento degli animali da laboratorio. Nelle stanze di stabulazione non è presente luce naturale, ma viene fornita un'illuminazione artificiale controllata, con uno spettro il più vicino possibile a quello naturale, per garantire agli animali un regolare ciclo giorno/notte. Il ciclo di **12 h di luce** alternate a **12 h di buio** è il più usato ed è regolato da *timer* elettronici.

Un'illuminazione compresa tra i **130** e i **325 lux** a livello di gabbia è considerata corretta per una buona stabulazione degli animali e per il lavoro degli operatori (ILAR, 2011).

Si devono prevedere fonti di illuminazione che consentano la continuazione delle attività in caso di interruzione dell'alimentazione di rete.

Rumore

Secondo il D. Lgs. 81/08, nell'uomo un livello di esposizione settimanale al rumore (**LEX**) di **85 dB** è considerato pericoloso. Questo valore è stato dimostrato essere il limite anche per gli animali, e l'esposizione a suoni superiori a 85 dB può avere effetti negativi sul benessere (ILAR, 2011). L'udito di questi animali può percepire ultrasuoni con una frequenza maggiore di **20 kHz**, non udibili dall'orecchio umano e che possono essere prodotti da **apparecchiature** presenti nello stabulario, come lavagabbie e lavabottiglie, computer, oscilloscopi, BSC, ecc. Queste devono essere perciò poste a un'adeguata **distanza** dalle stanze che ospitano gli animali. Anche gli scaffali ventilati producono un certo rumore e ciò deve essere considerato al momento della scelta delle attrezzature. Inoltre, fonti sonore come radio non dovrebbero essere usate nelle stanze di stabulazione, a meno che non facciano parte di un protocollo sperimentale o di un programma di arricchimento ambientale. Gli **allarmi** dovrebbero emettere suoni al di fuori della gamma udibile dagli animali.

Gabbie e arricchimenti ambientali



Figura 9: ICV con bottiglia inserita e piano rialzato. *IWT S.r.l.*

In genere i roditori vengono ospitati in gabbie alloggiare all'interno di uno scaffale o *Rack*. Esse possono essere **aperte** ed eventualmente dotate di panni filtro sul coperchio, oppure essere **chiuse** ermeticamente ed alloggiare in scaffali che assicurano un circuito di ventilazione indipendente in ciascuna gabbia (Fig. 1 e 2).

Le attrezzature sono scelte in base al tipo di contenimento microbiologico che si vuole mantenere.

Gli animali sono stabulati in gruppi di individui compatibili, ad esclusione di quelli per natura solitari, o per motivi sanitari o per irrinunciabili motivi sperimentali.

Nell'Allegato III, sezione B, del D. Lgs. 26/2014 sono riportate indicazioni sulle **superfici minime** delle gabbie, scelte in base alla specie, al numero di animali presenti, al loro peso e allo stato fisiologico in cui si trovano, es. femmina con prole. Gli animali devono disporre di spazio sufficiente a svolgere un'adeguata attività locomotoria, ridurre i comportamenti legati allo stress, come le stereotipie, ed esprimere comportamenti specie-specifici, come nascondersi e costruire il nido. A tal fine, è importante che la gabbia sia fornita di **arricchimenti ambientali**, cioè strutture che favoriscano l'attività fisica, di foraggiamento, manipolativa e cognitiva, adatte alla specie stabulata.

Esempi di arricchimento sono: la presenza di conspecifici nella propria gabbia, materiale per la costruzione del nido, tunnel, legno da rosicchiare, ecc. (Fig. 10). Questo materiale può essere sia "usa e getta", come ad esempio le cassette-nido in cartone, sia in plastica resistente alle alte temperature e dunque sterilizzabile.



Figura 10: Gabbia con arricchimento ambientale. *Rodinò et al. 2020.*

Lettieria

Esistono varie tipologie di lettiera, alcune più adatte a favorire comportamenti di “scavo”, altre a ridurre l’accumulo di ammoniaca. Le più diffuse sono a base di **legno, cotone e mais**.

La lettiera deve essere **sterilizzata** in autoclave o irradiata sottovuoto, se destinata ad animali SPF e GF.

I roditori **marcano** il territorio con l’**urina**. La frequenza del cambio di lettiera dipende dal tipo di gabbia, dal tipo e numero di animali e dalle esigenze sperimentali.

Le gabbie che ospitano gli animali **sentinella** utilizzati per i controlli sanitari (vedi cap. 2.4.2) devono essere periodicamente contaminate con la lettiera sporca proveniente da ciascuna gabbia dello stesso *Rack*.

Dieta

Un topo mangia all’incirca 3-4 g di cibo al giorno.

La composizione e le modalità di somministrazione della dieta incidono sul benessere dell’animale e sui risultati sperimentali, poiché influenzano lo stato di salute, il metabolismo e le prestazioni degli animali. Il cibo viene somministrato *ad libitum*, anche se i topi si alimentano specialmente durante la fase di buio. Il fabbisogno energetico di un animale dipende dalla sua specie, dal ceppo e dalla condizione fisiologica in cui esso si trova. Una dieta per animali in crescita o in fase di riproduzione è più ricca in grassi e proteine rispetto a una dieta di mantenimento per adulti.

I topi e i ratti possono assumere quantità sufficienti di vitamine K e B12 anche tramite la coprofagia, poiché la loro flora intestinale sintetizza questi nutrienti. Gli animali SPF, invece, possono avere una flora intestinale potenzialmente carente di microrganismi; dunque, è consigliabile integrare la loro dieta con una maggiore quantità di vitamine K e B.

Le diete per gli animali da laboratorio sono classificate in base al grado di purificazione degli ingredienti che le compongono in diete standard, purificate, chimicamente definite e medicate (Lipman et al., 2015).

Le diete in commercio si possono presentare sotto forma di *pellet*, farine o allo stato semi-liquido. Il *pellet* è la forma più utilizzata per i suoi costi contenuti, per

la sua resistenza a irrancidimento e contaminazioni/infestazioni e per la sua facilità di stoccaggio.

Gli attrezzi usati per l'alimentazione (es. mangiatoie) sono regolarmente puliti e sterilizzati.

Acqua

Un topo beve all'incirca 15 mL/100 g PV/die.

L'acqua di abbeverata deve essere fresca, potabile e non infetta. Essa viene fornita *ad libitum* mediante sistemi automatici, bottiglie o sacchetti monouso. Le bottiglie rappresentano il sistema più utilizzato perché economiche, facili da gestire e adatte anche per la somministrazione di farmaci. È necessario prevedere sistemi per la purificazione e il controllo microbiologico dell'acqua: l'acidificazione (pH: 2.5-3); la clorazione (Cl: 0.5-10 ppm); i raggi ultravioletti, generalmente associati a osmosi inversa; l'ozonizzazione; la filtrazione con prefiltri di 5-10 µm (per sabbia, ecc.) e filtri di 0.2 µm (per batteri, ecc.) (Lipman *et al.*, 2015).

L'acqua può essere sterilizzata in autoclave per eliminare batteri, spore, virus e funghi, ma non alcune tossine prodotte da batteri gram-negativi. Sono consigliati controlli periodici del pH e della durezza dell'acqua e un monitoraggio microbiologico e chimico. Il cambio dell'acqua è in relazione alla grandezza delle bottiglie, al numero degli animali ospitati e alla frequenza del cambio gabbie. Nel lavaggio di bottiglie e cappucci si deve prestare particolare attenzione alle ghiera, poiché sono i luoghi in cui si annidano più facilmente microrganismi.

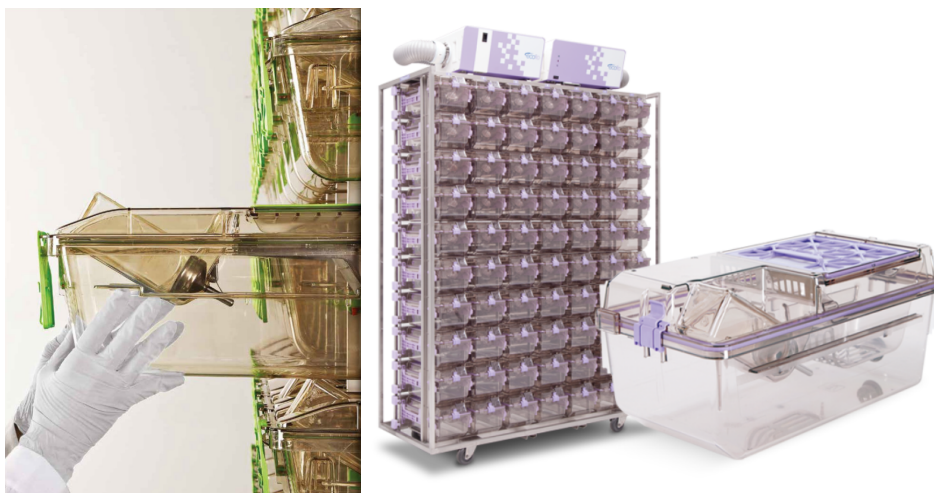


Figure 11 e 12: IVC housing con bottiglie inserite. IWT S.r.l. e Allentown Inc.

2.3.6 Procedure di pulizia, sanitizzazione e sterilizzazione

I metodi e la frequenza di pulizia e disinfezione dei locali e delle attrezzature presenti in uno stabulario dipendono dallo stato microbiologico degli animali (GF, SPF, CV), dalle loro caratteristiche fisiologiche e comportamentali, dal tipo di attrezzature e lettiera, da temperatura, umidità, efficienza dell'impianto di condizionamento, ecc.

La **lettiera** deve essere cambiata con una frequenza adeguata a mantenere le gabbie pulite e asciutte: essa può variare da giornaliera a settimanale, fino a ogni 15 giorni se sono poco affollate. Si cerca di evitare il cambio della lettiera nei giorni precedenti e successivi al parto e durante il periodo dell'accoppiamento, per non stressare gli animali.

Le **gabbie** e le **bottiglie** di abbeverazione andrebbero sostituite e lavate a ogni cambio di lettiera.

I macchinari che si occupano del **lavaggio** delle attrezzature solitamente alternano, nei vari cicli di lavaggio, prodotti **alcalini** ad **acidi**. I primi servono a rimuovere i residui organici, i secondi a neutralizzare i prodotti alcalini, evitando che rovinino le attrezzature. La temperatura del lavaggio si trova tra i **55-60°C**, quella del risciacquo intorno agli **80°C**. Per abbattere la carica batterica bisogna associare al lavaggio anche la **disinfezione** e/o la **sterilizzazione**. È bene alternare i prodotti utilizzati, in modo tale da evitare lo sviluppo di resistenze da parte dei microrganismi. Sono consigliati prodotti a base di sali quaternari di ammonio oppure formulazioni multiattive di tensioattivi, acidi organici, agenti ossidanti, ecc.

La **sterilizzazione** di tutto ciò che viene introdotto nello stabulario può avvenire tramite l'uso di **autoclavi** (T di 121°C per almeno 20 minuti), **gas** (perossido di idrogeno, ossido di etilene, formaldeide), **radiazioni** (irradiazione a raggi gamma a 2,5 Mrad) e **a secco** (T di 160°C per 120 minuti).

L'efficacia della sterilizzazione dovrebbe sempre essere verificata attraverso analisi microbiologiche dei materiali processati.

Il materiale di grosse dimensioni e le stanze di stabulazione sono sterilizzati per fumigazione con perossido d'idrogeno (H₂O₂) o formaldeide al 25% per circa 15 minuti, lasciando poi agire i prodotti nella stanza sigillata per 24 ore prima di riaccendere la ventilazione.

Il materiale che non può essere inserito in autoclave, come la plastica, viene sterilizzato all'interno di una *spray box*, ovvero una camera stagna dove un nebulizzatore spruzza per es. una soluzione di acido peracetico al 4% per circa 10 minuti.

Infine, il materiale inerte per il quale non si possono usare altre metodiche può essere trattato con raggi gamma (25 KGy) presso ditte specializzate.

Controllo degli infestanti

La presenza di infestanti come i roditori selvatici e gli insetti deve essere evitata attraverso l'implementazione di programmi di prevenzione, controllo ed eliminazione. Vanno individuate le possibili vie di accesso degli infestanti e programmati i monitoraggi periodici degli ambienti, soprattutto per le zone a rischio di attirare animali esterni, come i magazzini per lo stoccaggio del mangime. L'accesso agli infestanti va impedito per es. attraverso l'uso di "barriere" di metallo e griglie elettriche per i roditori, bulbi luminosi e carta moschicida per gli insetti.

2.4 Controlli sanitari e monitoraggio ambientale in stabulario

Mähler et al., 2014

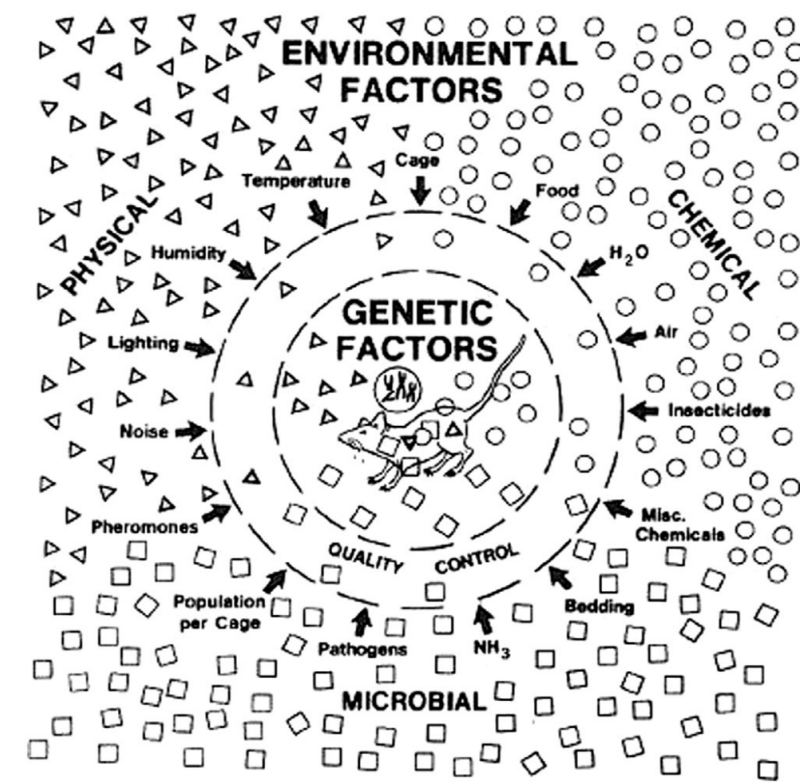


Figura 13: Fattori che influenzano la sperimentazione. *Lipman et al., 2015.*

La **standardizzazione microbiologica** è una condizione necessaria alla produzione di animali che soddisfino requisiti preimpostati di qualità microbiologica. È importante che questa venga mantenuta durante gli esperimenti, poiché la salute degli animali da laboratorio influenza il loro utilizzo sperimentale (Nicklas et al., 1999; 2002). Si è osservato infatti che anche gli agenti che difficilmente provocano segni clinici nell'animale sono capaci di aumentare la variabilità individuale, rendendo necessario un aumento degli animali per la riuscita dell'esperimento. La maggior parte degli agenti patogeni provoca infezioni asintomatiche, ma è stato dimostrato che molti agenti, anche se clinicamente silenti, influenzano le funzioni psicologiche e immunologiche dell'individuo.

Inoltre, i microrganismi capaci di infettare gli animali da laboratorio possono talvolta passare anche all'uomo (zoonosi).

2.4.1 Health Monitoring Program (HM)

Considerando che l'assenza di manifestazioni cliniche di infezione non ha sempre un grande valore diagnostico, è bene che presso lo stabulario si sviluppi un programma di controllo sanitario e di sorveglianza microbiologica - **Health Surveillance or Health Monitoring Program (HM)** - ai fini di rilevare gli agenti patogeni.

Lo stabulario è un ambiente controllato ad accesso limitato: l'infrastruttura, le procedure adottate e la sorveglianza esercitata ne dovrebbero garantire la categoria di appartenenza (barrierato o convenzionale).

L'ingresso di **microrganismi indesiderati** (virus, batteri, funghi e parassiti) è dovuto principalmente ai seguenti fattori: **animali, materiali biologici, attrezzature e personale**.

Il rischio di contaminazione è generalmente inferiore nelle unità riservate all'allevamento rispetto alle unità sperimentali, poiché la movimentazione di personale e animali è minore e controllata in maniera più rigorosa (Pritchett-Corning et al., 2014).

- 1) Il primo **controllo igienico-sanitario** è quello **diretto** sugli animali e sui loro prodotti. Le osservazioni giornaliere dei tecnici di stabulario e dei ricercatori sono fondamentali per individuare i malati, i feriti e i morti, per

rilevare segni clinici o comportamentali indicativi di processi patologici, lesioni, stress, dolore e per effettuare campionamenti.

- Mouse Grimace Scale (MGS): i criteri per valutare la risposta al dolore sono specie-specifici e oggetto continuo di ricerca; il personale deve essere addestrato a riconoscerli. Dal 2010 è stata sviluppata la MGS, che sfrutta cinque elementi espressivi: l'apertura dell'occhio, l'arricciare il naso, l'evidenza degli zigomi, la posizione dei padiglioni auricolari e delle vibrisse. Tali elementi sono classificati secondo tre livelli di gravità del dolore percepito dall'animale (IZSVE, 2019).

Altri segni di sofferenza sono: comportamento normale ridotto/soppresso; schiacciamento sul ventre; estensione degli arti posteriori; spasmi, contorcimenti, barcollamento; inarcamento della schiena; deambulazione anormale; leccamento; grattamento o pulitura fino a lesionarsi; assenza del comportamento di nidificazione; ecc. (CCAC, 2019).

- Body Condition Score (BCS): è una scala da 1 a 5 che consente una valutazione rapida, non invasiva ed efficace del benessere fisico di un animale. A differenza del peso corporeo, essa discrimina tra grasso, riserve muscolari, crescita di masse tumorali, accumulo di liquido ascitico, organomegalia, gravidanza, ecc.

- 2) Il secondo tipo di controllo è rappresentato dai **test diagnostici** diretti e indiretti (vedi cap. 2.4.3) per verificare che lo stato di salute della colonia sia tutelato e che le prassi igienico-sanitarie e le procedure operative messe in atto vengano rispettate (IZSVE, 2019).

In Europa la "*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*" (**FELASA**) ha pubblicato un documento con le **raccomandazioni** per la realizzazione di programmi **HM** adeguati alle diverse specie (*Tab. 1*).

Per allineare i programmi sanitari internazionali, facilitando gli scambi di animali e dei loro prodotti, è stato costituito un gruppo di lavoro congiunto con la American Association for Laboratory Animal Science (AALAS), ovvero "**AALAS/FELASA Working Group on Health Monitoring of Rodents for Animal Transfer**" (Pritchett-Corning et al., 2014).

La guida FELASA si uniforma a quelle in uso in altri continenti, inclusa la tipologia dei saggi e la frequenza dei test. Queste informazioni vengono periodicamente aggiornate, insieme ai riferimenti bibliografici.

Le raccomandazioni attualmente prevedono un programma di monitoraggio **trimestrale** per i patogeni prevalenti e **annuale** per i patogeni non prevalenti e per quelli rari. Tale programma **varia** in caso di sospette **contaminazioni**, durante piani di **eradicazione** e controllo di patogeni accertati, nei programmi di **riderivazione** embrionale/cesarea o per lotti di animali che dalla quarantena devono passare in stabulari **barrierati**.

Le linee guida non hanno un valore normativo, ma sono ormai comunemente riconosciute e utilizzate come riferimento dalla maggior parte degli Istituti nazionali e internazionali. È importante sottolineare che le raccomandazioni non impongono come requisito che tutti gli animali siano esenti da tutti i microrganismi testati. Tali disposizioni dovrebbero infatti essere adattate alle esigenze individuali e locali, agli obiettivi di ricerca, alla prevalenza locale di agenti specifici, all'esistenza di schemi di monitoraggio nazionali e ad altre normative come quelle relative alla produzione di sieri e vaccini.

Tabella 1: Raccomandazioni per il monitoraggio di agenti infettivi e frequenza dei controlli nel topo da laboratorio. *Mähler et al., 2014.*

	Trimestrale	Annuale
Virus:		
Mouse hepatitis virus (MHV)	x	
Mouse rotavirus (MuRV)		x
Murine norovirus (MNV)	x	
Parvovirus		
Minute virus of mice (MVM)		x
Mouse parvovirus (MPV)		x
Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)	x	
Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)		x
Mouse adenovirus di tipo 1 (MAd FL)	x	
Mouse adenovirus di tipo 2 (MAd K87)		x
<i>Ectromelia virus</i> (mousepox, ECTV)		x
Pneumonia virus del topo (PVM)		x
Reovirus di tipo 3 (Reo 3)		x
Sendai virus (SeV)		x
Batteri:		
<i>Helicobacter</i> spp.		x

(se +: *H. hepaticus*, *H. bilis* e *H. typhlonius*)

<i>Pasteurella pneumotropica</i>		x
<i>Streptococcus</i> Beta-hemolytic (no gruppo D)	x	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	x	
<i>Citrobacter rodentium</i>		x
<i>Clostridium piliforme</i>		x
<i>Corynebacterium kutscheri</i>		
x		
<i>Mycoplasma pulmonis</i>		x
<i>Salmonella</i> spp.		x
<i>Streptobacillus moniliformis</i>		x

Parassiti:

Endo ed ectoparassiti (genere)	x	
--------------------------------	---	--

Altri agenti (opzionale):

Virus:

- Hantavirus
- Herpesvirus (mouse cytomegalovirus, mouse thymic virus)
- Lactate-dehydrogenase elevating virus
- Polyomavirus (mouse polyomavirus, K virus)

Batteri e funghi:

- Cilia-associated respiratory bacillus
- Klebsiella oxytoca*
- Klebsiella pneumoniae*
- Altre *Pasteurellaceae*
- Pneumocystis murina*
- Pseudomonas aeruginosa*
- Staphylococcus aureus*

Altro (se necessario).

Altri agenti emergenti possono essere scoperti in qualsiasi momento. Essi rappresentano una sfida per i programmi HM: per rilevarli è necessario sviluppare test diagnostici, comprenderne l'epidemiologia e le vie di trasmissione. Serve inoltre del tempo per osservare l'effettivo impatto di un agente microbiologico sulla salute e sulla ricerca. Per questi motivi, si consiglia di prestare cautela prima di aggiungere tali organismi a un elenco di monitoraggio.

Gli animali che entrano in uno stabulario devono provenire da fornitori che seguono le raccomandazioni FELASA sul monitoraggio sanitario (Tab. 2). Questo non è possibile nel caso di ceppi transgenici che non possono essere ottenuti da

fonti commerciali: in casi come questo si prendono in considerazione forme di gestione del rischio come la quarantena.

Tabella 2: Informazioni consigliate per un report di monitoraggio sanitario (HM). *Mähler et al., 2014.*

- Nome dell'**unità** e condizioni di **alloggiamento** (es. IVC);
- **Specie** e **ceppi** presenti all'interno dell'unità (un HM per specie);
- Data dell'**ultima indagine** e data di emissione del verbale;
- **Frequenza** del **test** per ciascun agente;
- **Agenti** per i quali viene effettuato il monitoraggio, elencati in ordine alfabetico all'interno della loro categoria microbica e identificati a livello di specie, ove necessario;
- **Metodo di prova** utilizzato per ciascun agente e nome del **laboratorio** di prova;
- **Risultati** dell'ultima indagine e di tutte le indagini effettuate (idealmente dal momento di costituzione dell'unità), devono esserci almeno quelle svolte nei **18 mesi** precedenti (n. animali positivi/n. animali esaminati). I risultati dei test non inclusi nel programma HM standard sono aggiunti come informazioni supplementari.
- I risultati degli esami patologici devono essere registrati scrivendo: le **lesioni** sono state/non sono state osservate negli animali esaminati.
- Spazio per i **commenti**, es. trattamenti; data del primo e dell'ultimo ritrovamento di un agente; ecc.
- Nome e contatti della persona **responsabile** dell'ideazione del programma HM;
- Descrizione del **programma** HM complessivo.

2.4.2 Unità microbiologica

Un'unità microbiologica è un ambiente dalle caratteristiche microbiologiche omogenee, dove la potenziale esposizione degli animali agli agenti patogeni è la stessa, ad es. stanza di stabulazione, IVC, isolatore, ecc.

È importante sottolineare che ogni IVC può rappresentare una subunità microbiologica dello stesso *Rack*, e dunque che in quel caso un *Rack* si compone di tante unità microbiologiche quante sono le gabbie.

Un efficace programma HM prevede la suddivisione dello stabulario in unità microbiologiche al fine di eseguire periodicamente test diagnostici sugli animali secondo criteri epidemiologici (Mähler *et al.*, 2014). Il programma HM dovrebbe riflettere il livello di rischio dell'unità in questione, ed è influenzato anche dagli effetti che un agente può avere su un programma di ricerca. La frequenza del monitoraggio è determinata anche dalle caratteristiche biologiche e dalla prevalenza degli agenti infettivi: quelli altamente infettivi con un'elevata prevalenza dovrebbero essere testati frequentemente.

2.4.3 Topi sentinella

I controlli possono essere eseguiti sia sugli animali **residenti**, sia sugli animali **sentinella**. I primi sono animali appartenenti alle colonie già presenti nello stabulario e vengono testati negli stabulari convenzionali, dove una stanza di stabulazione rappresenta in genere un'unità microbiologica. I secondi sono animali solitamente acquisiti da un fornitore autorizzato esterno, possibilmente di categoria SPF, e vengono utilizzati negli stabulari SPF e GF.

I topi scelti per il controllo devono avere il sistema immunitario **maturo**, provenire da ceppi **immunocompetenti**, essere **rappresentativi** della popolazione da controllare ed essere stati adeguatamente **esposti** a tutti i possibili patogeni presenti nell'ambiente.

Formula "ILAR"

In un allevamento contenente almeno cento animali dello stesso ceppo tenuti in gabbie aperte secondo procedure di manipolazione convenzionali, per calcolare la dimensione del campione necessaria a valutare lo stato microbiologico si utilizza la "formula ILAR". La numerosità campionaria (campione randomizzato) dipende dall'infettività dell'agente patogeno e dalla probabilità di errore del risultato:

$$S = \log p / \log N$$

in cui **S** è la dimensione del campione, **p** è la probabilità dell'errore del risultato, **N** è la percentuale di animali non contaminati (Nicklas *et al.*, 2002).

Devono essere campionati animali di tutte le età e di entrambi i sessi, provenienti da gabbie diverse all'interno dell'unità microbiologica.

La “formula ILAR” non è appropriata per il monitoraggio di colonie di animali tenuti in isolatori, IVC, ecc., in quanto ciascuna di queste rappresenta una subunità microbiologica dell'intero *Rack*.

Sentinelle

Negli stabulari SPF e GF il monitoraggio sanitario avviene sulle sentinelle. La gabbia contenente le sentinelle ospita tra i 2 e i 5 individui e si posiziona nella parte più bassa del *Rack*, nelle stesse condizioni di stabulazione degli altri animali. Le sentinelle vengono regolarmente esposte ai patogeni attraverso il contatto con lettiera, cibo e acqua prelevati da ciascuna delle altre gabbie secondo un programma predefinito.

Non tutti gli agenti possono essere facilmente trasferiti attraverso la lettiera sporca o l'aria di scarico; quindi, in alcune circostanze le sentinelle possono essere tenute nella stessa gabbia degli animali da monitorare.

Per utilizzare le sentinelle a fini diagnostici è necessario attendere **10-12** settimane dall'inizio dell'esposizione per consentire lo sviluppo della **risposta anticorpale** (che in genere impiega 6 settimane) e favorire l'infezione e/o la sieroconversione anche degli agenti con “periodi finestra” più lunghi.

È buona norma sottoporre a screening completo solo una parte delle sentinelle disponibili, sostituendole con nuovi animali in modo tale che restino in contatto con quelle rimaste. Queste precauzioni consentono di potenziare l'efficacia dell'esposizione, ma anche di avere degli animali di riserva in caso di dubbi o positività/negatività incerte.

2.4.4 Test diagnostici

Lo stato sanitario degli animali può essere monitorato attraverso una combinazione dei diversi sistemi di **analisi**, dell'**anamnesi** e della **sintomatologia** clinica.

I test diagnostici possono essere indiretti (analisi sierologiche) o diretti (analisi molecolari o colturali) (Mähler *et al.*, 2014).

➤ Test indiretti

I metodi sierologici sono in genere utilizzati per lo screening dei virus e di alcuni batteri. Questi sono: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (**ELISA**),

Hemagglutination inhibition test (HAI), Immunofluorescent Assay (IFA) o Multiplexed Fluorometric Immunoassay (MFIA).

I vantaggi della sierologia sono la praticità, la possibilità di avere una panoramica immediata della presenza di diversi patogeni, la sensibilità elevata e i costi contenuti; lo svantaggio è che può dare delle false positività per reazioni crociate dovute ad anticorpi che reagiscono con antigeni non sempre specifici.

➤ Test diretti

I metodi diretti sono: esami **colturali**, **parassitologici**, **necroscopici** e **istopatologici** e analisi molecolari come la *Polymerase Chain Reaction (PCR)*.

- Gli esami colturali e la PCR sono molto specifici e possono individuare un'infezione in atto.
- La **PCR** ricerca direttamente il DNA/RNA dell'agente infettivo ed è utile per identificare i **virus** e gli agenti infettivi persistenti nei tessuti, gli agenti per cui non esistono altri metodi diagnostici adeguati, per rilevare malattie in animali immunodepressi (risposta anticorpale assente o scarsa) e per la rilevazione precoce degli agenti prima che si verifichi la sierconversione (< 14 giorni).

La PCR richiede un'attenta selezione degli animali e dei tessuti da valutare poiché gli organismi bersaglio devono essere presenti al momento del test nel campione valutato.

- Gli esami **necroscopici** e **istopatologici** hanno al momento un ruolo limitato, poiché la maggior parte degli agenti circolanti nelle strutture che ospitano roditori da laboratorio non causa malattie o lesioni. Pertanto, l'assenza di manifestazioni cliniche o la mancanza di lesioni all'esame necroscopico non ha alcun valore diagnostico o questo è molto limitato. Tali esami possono costituire degli strumenti di integrazione e conferma dell'ipotesi diagnostica, consentendo talvolta di distinguere gli effetti causati dal protocollo sperimentale da quelli causati dall'infezione (Pritchett-Corning *et al.*, 2014).
- Gli esami **parassitologici** vanno alla ricerca di endo ed ectoparassiti. Gli endoparassiti, soprattutto i protozoi, possono essere ricercati mediante l'analisi microscopica delle feci o della mucosa intestinale.

Gli ectoparassiti (es. pulci, acari e pidocchi), possono essere osservati allo stereomicroscopio attraverso l'analisi del pelo.

Nei casi dubbi, i parassiti sono ricercati tramite le analisi molecolari.

- Le **colture** vengono utilizzate per la rilevazione di **batteri** e, se necessario, possono essere effettuate su terreni selettivi per un'identificazione più precisa. Questa operazione però non è un metodo rapido, poiché necessita di tempo e del rispetto di condizioni specifiche (come la temperatura). I campioni vengono prelevati da siti quali la mucosa genitale, l'intestino crasso, la rinofaringe, la trachea, ecc.
- Alcuni produttori di IVC hanno progettato dei sistemi di rilevamento dei patogeni attraverso le analisi tramite **PCR dell'aria esausta** e del particolato degli scaffali ventilati (Mähler *et al.*, 2014).

I risultati **positivi** possono portare all'adozione di misure drastiche in una struttura, come l'**abbattimento** degli animali o l'**interruzione** degli **esperimenti**. Per questo motivo è importante **confermare** i risultati utilizzando altri metodi diagnostici e, se possibile, appoggiandosi anche a un altro laboratorio. Risultati contrastanti o borderline vanno esaminati ulteriormente.

Dovrebbe essere messo in atto un piano d'azione per la **gestione** sanitaria in **attesa** di risultati confermativi al fine di evitare la potenziale diffusione di contaminanti. I processi di conferma in corso dovrebbero essere menzionati come informazioni aggiuntive nel rapporto HM.

È importante specificare che un rapporto HM non è un rapporto di laboratorio. Il rapporto di laboratorio è semplicemente l'insieme dei risultati forniti dal laboratorio di analisi su campioni provenienti da animali testati. Esso non consente di trarre conclusioni sullo stato microbiologico dell'unità analizzata, perché deve essere integrato con le informazioni fornite dal rapporto HM completo.

Monitoraggio ambientale

Per minimizzare la possibilità di diffusione di agenti patogeni tra gli animali è necessario effettuare verifiche e manutenzioni periodiche dell'ambiente.

I **filtri** del **condizionamento** e sistemi di **umidificazione** devono essere regolarmente controllati e sostituiti per evitare che diventino un mezzo di

contaminazione.

Gli ambienti dello stabulario, compresi quelli forniti di filtri HEPA, devono essere esaminati strisciando dei **tamponi sterili** sulle varie **superfici**. I tamponi vengono poi **piastrati** su terreni di coltura per verificare un'eventuale crescita batterica. In alternativa o in associazione si possono utilizzare sistemi **SAS** (*Surface Air System*) ovvero apparecchi che aspirano l'aria e trattengono il particolato a livello di un filtro che poi viene messo a incubare.

In uno stabulario **barrierato**, tutto il materiale che viene introdotto deve essere **sterilizzato**. Le sostanze utilizzate per la sterilizzazione vanno sottoposte a periodiche analisi microbiologiche, così come i dispositivi di protezione individuale e le docce degli operatori.

Anche l'**acqua** utilizzata per l'abbeverazione degli animali può essere un veicolo di patogeni e pertanto deve essere soggetta a regolari **trattamenti** e **controlli** microbiologici.

L'impianto di **ventilazione** della stanza è **isolato** da quello generale.

Controllo del personale

Il personale di ricerca e quello addetto alla cura degli animali possono agire come portatori o vettori di infezioni dalle unità contaminate a quelle non contaminate, facilitando eventualmente la diffusione di zoonosi (Newcomer et al., 2007).

I microrganismi possono trovarsi nel pelo, sulle mani, sugli indumenti del personale che è stato a contatto con animali infetti.

Il personale deve essere formato e fornito di mezzi di protezione individuale idonei (DPI), scelti a seconda dell'attività svolta e dei rischi a essa connessi.

Il personale che entra in uno stabulario barrierato deve fare una **doccia** completa (aria o acqua) e indossare **indumenti sterili** e **protettivi**.

È bene evitare che gli stessi operatori lavorino in più strutture di stabulazione: devono trascorrere almeno **72 ore** tra la frequentazione di uno stabulario e il successivo. Gli operatori non possono nemmeno entrare in contatto con i roditori tenuti come animali domestici nelle 48 ore antecedenti.

2.4.5 Interventi in caso di contaminazione - *Facility Outbreak*

Se il controllo sanitario rileva un focolaio di infezione, il responsabile dello stabulario deve gestire l'emergenza attuando un piano di intervento per l'**eradicazione** del microrganismo, più o meno patogeno, presente.

Per confermare la positività si eseguono: una **ripetizione** del **test** sullo stesso campione con la stessa metodica, un test sullo stesso campione con una **metodica alternativa**, una **PCR** su campioni di organo o tessuto, un test appoggiandosi a un **laboratorio diverso** dal primo (Pritchett-Corning *et al.*, 2014).

Se la positività è confermata, tutte le **procedure** svolte nell'area interessata vengono **fermate**, specialmente la movimentazione di animali. Dopodiché vengono svolti **test addizionali** sulla stessa colonia e su quelle adiacenti, con campionamenti più numerosi e ricercando direttamente il patogeno in esame. Vengono poi **valutati** i **danni** e si cerca di individuare la **fonte di contaminazione**: in genere si tratta di errori procedurali o problematiche a impianti e attrezzature; una volta risolte, non dovrebbero avvenire successive contaminazioni.

Dopo aver identificato gli agenti contaminanti, ci sono tre possibilità d'azione:

- 1) Si accetta la nuova situazione epidemiologica dello stabulario SPF e si **modifica** la **lista di esclusione** dei patogeni;
- 2) Si effettua un **trattamento** terapeutico (considerando però che ne esistono di efficaci solo per i parassiti e per alcuni batteri);
- 3) Si provvede all'**eradicazione** del patogeno attraverso l'**eliminazione** degli animali contaminati ed esposti. Se ciò non dovesse essere possibile per ragioni sperimentali e/o per l'unicità del ceppo, si dovrebbe ridurre la popolazione interessata per minimizzare la trasmissione, stabulando poi gli individui non soppressi all'interno della quarantena, se possibile in pressione negativa.

Con i ceppi scientificamente rilevanti, si può effettuare la **riderivazione**. La **r. cesarea** è il prelievo sterile dell'utero di un animale a fine gravidanza, la sua apertura e l'affidamento dei neonati a una madre adottiva non contaminata. La **r. embrionale** è il prelievo in condizioni di sterilità degli embrioni, che dopo opportuno trattamento sono impiantati nell'ovidotto o nell'utero di una femmina non contaminata.

Un'alternativa alla riderivazione può essere il *cross-fostering*, ovvero l'affidamento in sterilità entro le 24 ore dalla nascita ad una madre adottiva non contaminata (Buxbaum *et al.*, 2011).

Se si sceglie di eliminare una colonia, si devono eliminare anche tutti i **materiali** entrati in contatto con essa (es. mangime, segatura, guanti, ecc.), **svuotare** gli ambienti, smontare le attrezzature e sanitizzare scaffali, gabbie e accessori, **sterilizzare** ciò che è possibile (soprattutto in caso di contaminazione virale). I filtri delle gabbie, del sistema di condizionamento e delle cappe devono essere sostituiti con **filtri nuovi**. Al termine di questa fase bisogna rispettare un periodo di **vuoto sanitario**, ovvero gli ambienti non devono ospitare animali e personale per almeno **7-10 giorni**. Successivamente si procede nuovamente con la **pulizia** e la **sanitizzazione** degli ambienti.

Per **verificare** l'efficacia delle procedure adottate è bene ripetere le analisi microbiologiche ambientali. Inoltre, nuovi animali **sentinella** devono essere introdotti nelle stanze e sottoposti a screening specifico dopo un adeguato periodo di permanenza, prima di stabulare la nuova colonia animale. Se tutti i test risultano negativi si possono riprendere le attività consuete, sbloccando tutte le procedure e ripopolando gli ambienti con animali nuovi, di sicura e garantita provenienza.

Si **conferma** che il patogeno è scomparso definitivamente quando risultano **negativi** tutti i monitoraggi sanitari effettuati nei successivi **sei mesi** nelle aree contaminate e in quelle limitrofe.

2.4.6 Importazione, scambio e trasporto di animali

Gli animali devono essere trasportati in condizioni appropriate tali da **ridurre** al minimo **sofferenza** e **stress** in relazione alla specie, alla durata dello spostamento e al tipo di mezzo impiegato (Swallow *et al.*, 2005).

Il trasporto può esporre gli animali a incidenti e a contaminazioni di patogeni. Gli animali con difetti del sistema immunitario e/o provenienti da stabulari barriera sono particolarmente sensibili ai patogeni, compresi quelli opportunisti.

Il veterinario dello stabilimento e il veterinario ASL devono accertare che gli animali siano sani, altrimenti essi non possono essere trasportati, se non per

motivi diagnostici e terapeutici o per scopi scientifici e di ricerca che giustificano il rischio aggravato di mortalità durante il trasporto. È **vietato** trasportare animali **infettati** sperimentalmente.

La protezione degli animali durante il trasporto e le operazioni correlate sono controllate dal Reg. (CE) 1/2005.

Quando degli animali vengono spediti in un nuovo stabulario, devono essere accompagnati da una certa **documentazione**:

- **Informazioni generali** (sesso, età, numero, data di arrivo prevista);
- **Certificato sanitario** rilasciato dal Veterinario dello stabilimento di provenienza;
- **Report sanitario (HM)**.

In base ai criteri adottati dalla struttura ricevente, gli animali in arrivo saranno trasferiti o nello stabulario o in quarantena e saranno eventualmente sottoposti ad ulteriori analisi microbiologiche.

Tracciabilità

La tracciabilità degli animali è monitorata attraverso i registri degli animali, i quali devono essere presenti in ogni stabilimento ed essere aggiornati ogni settimana, conservati per almeno cinque anni e messi a disposizione del pubblico (Art. 27 del D. Lgs. 26/2014).

Essi contengono informazioni riguardanti:

- Il codice del lotto o di **identificazione** individuale, le specie e il numero di animali;
- La **provenienza** degli animali;
- L'**ente** da cui gli animali sono stati acquisiti;
- Le **date** dell'acquisizione;
- Il nome e l'indirizzo del **destinatario** degli animali;
- La data, la specie e il numero di animali **deceduti** o soppressi in ciascuno stabilimento, specificando la causa della morte;
- Le date di inizio e di termine delle procedure e i **progetti** nei quali gli animali sono usati.

2.5 Individuazione e prevenzione dei rischi

- **Pericolo** (*hazard*): una proprietà o qualità intrinseca di un determinato fattore che ha la potenzialità di causare danni.
- **Rischio** (*risk*): la probabilità che il fattore lesivo determini un danno (infortunio e/o malattia professionale) alle persone esposte. La stima di questa probabilità dipende dall'intensità dell'agente di rischio e dal tempo di esposizione a quell'agente.

Comunemente i rischi sono classificati in rischi per la **sicurezza** (possono provocare infortuni sul lavoro), rischi per la **salute** (possono provocare malattie professionali) e rischi dovuti all'organizzazione del lavoro, a fattori psicologici, ergonomici, a condizioni di lavoro difficili.

La **valutazione dei rischi** (*risk assessment*) tiene conto della **frequenza** di accadimento degli eventi e della **gravità** delle loro conseguenze.

Le **misure di prevenzione** hanno lo scopo di minimizzare la probabilità che un evento dannoso si verifichi, mentre quelle di **protezione** sono finalizzate a ridurre gli effetti. Per poter fare prevenzione è necessario che vi siano efficienti flussi informativi tra le varie figure presenti sul luogo di lavoro. Il Servizio di Prevenzione e Protezione della struttura deve essere a conoscenza di quali attività sono svolte nello stabulario, con quali animali, se sono utilizzati microrganismi patogeni e sono state effettuate delle modifiche. È importante che il personale dello stabulario e gli utilizzatori dei servizi conoscano le procedure da adottare in caso di emergenza.

L'ufficio acquisti deve conoscere le caratteristiche che devono avere i dispositivi di protezione da acquistare in relazione alle attività svolte o a condizioni particolari degli operatori.

- **Errore**: fallimento nella pianificazione e/o nell'esecuzione di una sequenza di azioni che può determinare eventi avversi.

L'analisi degli errori è un aspetto fondamentale per la valutazione e gestione dei rischi. In particolare, i *near miss* sono gli eventi che non hanno determinato conseguenze dannose, ma sono spie precoci di malfunzionamenti del sistema. La loro analisi consente di evidenziare le criticità e di individuare quali azioni

(strutturali, organizzative, comportamentali) adottare prima del verificarsi di danni alle persone.

I requisiti di salute e di sicurezza dei luoghi di lavoro sono indicati nell'Allegato IV del D. Lgs. 81/08.

Emergenze

Tutti i posti di lavoro devono poter essere evacuati rapidamente e in sicurezza secondo le procedure descritte nel piano di emergenza.

Deve essere presente un impianto di rilevazione incendi collegato con una centralina di allarme che produca segnali acustici e luminosi. Devono essere presenti degli estintori disponibili e facilmente identificabili, in numero e tipologia adeguati.

Tutte le verifiche, i controlli e le operazioni di manutenzione su sistemi, attrezzature e impianti antincendio, nonché l'attività di informazione e formazione antincendio dei lavoratori devono essere riportati su un apposito registro.

Agenti chimici

I prodotti chimici presenti negli ambienti di lavoro possono determinare rischio per la salute o la sicurezza.

Il Regolamento CLP - *Classification, Labelling and Packaging* (Reg. (CE) 1272/2008) è basato sui criteri di classificazione ed etichettatura del GHS, cioè del Sistema Globale Armonizzato nato sotto le Nazioni Unite.

È essenziale consultare le schede di sicurezza delle varie sostanze e conservarne copia facilmente accessibile nel luogo dove sono manipolate.

Gli operatori devono rispettare le procedure di sicurezza dei laboratori e utilizzare i **DPI** (guanti; occhiali; ecc.) adeguati. Le manipolazioni devono avvenire sotto **cappa chimica** o utilizzando sistemi di aspirazione localizzata. Lo **stoccaggio** delle sostanze deve essere effettuato negli appositi armadi. Lo **smaltimento** deve rispondere a quanto previsto per i rifiuti speciali.

Agenti fisici

Rischio di caduta e **traumi**, rischio di **sovraccarico** dell'apparato muscolo-scheletrico, rischio di **ferite** da taglio e punta, rischi da alte e basse **temperature**.

Allergie

Ripetuta e consistente esposizione a sostanze (allergeni) in grado di provocare in soggetti predisposti un'anomala reazione del sistema immunitario.

Gli allergeni presenti negli ambienti di lavoro possono essere di origine **animale** (es. acari, peli, escrementi, ecc.), **vegetale** (es. farine, lattice, ecc.), **fungina** (muffe), batterica (es. tossine), **chimica** (es. farmaci, disinfettanti, ecc.) (Anzidei et al., 2003).

Una patologia occupazionale rilevante per il personale degli stabulari è la **Laboratory Animal Allergy (LAA)**.

Numerosi studi hanno evidenziato che tra l'11% e il 44% dei lavoratori esposti continuamente agli animali da laboratorio riportano sintomi allergici correlabili al lavoro (Seward, 1999).

Le manifestazioni cliniche dell'allergia possono consistere in rash cutaneo, rinite o congiuntivite e, nelle forme più gravi, asma bronchiale o shock anafilattico. La sensibilizzazione è generalmente irreversibile e tende ad aggravarsi nei casi in cui la persona continui ad essere esposta alle sostanze allergizzanti.

Radiazioni ionizzanti

Il rischio da radiazioni ionizzanti è regolamentato dal D. Lgs. 101/2020 e riguarda la manipolazione ed eliminazione di animali ai quali siano stati somministrati radionuclidi.

Invece, animali trattati con raggi X e raggi gamma non costituiscono un rischio, e possono essere gestiti come normali animali da laboratorio.

Agenti biologici

Art. 267, D. Lgs. 81/08

- **Microrganismo:** *“entità microbiologica, cellulare e non cellulare, capace di replicarsi o trasferire materiale genetico, compresi virus, viroidi, cellule animali e vegetali in coltura”.*
- **Coltura cellulare:** *“il risultato della crescita in vitro di cellule derivate da organismi pluricellulari”.*
- **Agente biologico:** *“un qualsiasi microrganismo, anche se geneticamente modificato, coltura cellulare ed endoparassita umano, che potrebbe provocare infezioni, allergie o intossicazioni”* in lavoratori esposti, animali, piante.

- **Biosicurezza:** “*principi, tecnologie e pratiche di contenimento implementati per prevenire l'esposizione involontaria ad agenti biologici o il loro rilascio involontario*”.

Il **rischio biologico** è il rischio di contrarre una malattia determinata da un agente biologico capace di penetrare, moltiplicarsi e produrre effetti dannosi in un organismo vivente.

Le attività che comportano rischio di esposizione ad agenti biologici in uno stabulario sono: l'inalazione di aerosol infetti; l'apertura delle provette e il pipettaggio; la citometria; l'inoculazione parenterale con aghi di siringa o altri oggetti taglienti contaminati; il contatto di liquidi con le mucose; l'ingestione o esposizione attraverso il contatto di dita o oggetti contaminati con bocca e occhi; puntura o graffio di animale (Colavita, 2018).

L'80% dei casi di esposizione ad agenti biologici è dovuto a inalazione di **aerosol**: particelle liquide o solide sospese nell'aria e di dimensioni tali da consentire l'inalazione nel tratto respiratorio inferiore (< 10 μm).

L'Art. 268 del D. Lgs. 81/08 classifica i diversi agenti biologici in quattro gruppi in base al livello di rischio d'infezione:

Gruppo di rischio 1) Un agente che presenta poche probabilità di causare malattie in soggetti umani;

Gruppo di rischio 2) Un agente che può causare **malattia** in soggetti umani e costituire un rischio per i lavoratori. È poco probabile che si propaghino nella comunità, inoltre sono disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche (es. *Staphylococcus aureus*; *Clostridium tetani* e *C. botulinum*; ecc.);

Gruppo di rischio 3) Un agente che può causare **malattie gravi** in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori; l'agente biologico può propagarsi nella comunità, ma di norma sono disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche (ad es. *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Yersinia pestis*);

Gruppo di rischio 4) Un agente che può provocare **malattie gravi** in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori e può presentare un elevato rischio di **propagazione** nella comunità; **non** sono disponibili, di norma, **efficaci misure** profilattiche o terapeutiche (es. virus Ebola).

Se l'agente biologico non può essere classificato in modo inequivocabile in uno dei gruppi, esso va classificato nel gruppo di rischio più elevato.

Questa classificazione si basa sulle informazioni disponibili che consentono di misurare la pericolosità di un agente biologico:

- **Infettività:** capacità di un microrganismo patogeno di penetrare nell'ospite e di replicarsi;
- **Patogenicità:** capacità di un microrganismo patogeno di causare malattia a seguito di infezione; varia con il sottotipo o ceppo;
- **Trasmissibilità:** capacità di un microrganismo patogeno di essere trasmesso da un soggetto infetto a un altro;
- **Neutralizzabilità:** disponibilità di adeguate misure profilattiche per prevenire la malattia (vaccini, immunoglobuline) o di efficaci terapie per la cura (antibiotici, antivirali).

Per la stabulazione della maggior parte degli animali da laboratorio dopo la quarantena e per gli animali a cui vengono inoculati agenti del gruppo 1, non sono richieste particolari misure di contenimento.

Al contrario, il Datore di Lavoro che intenda utilizzare gli agenti biologici dei gruppi 2 o 3 deve comunicarlo all'organo di vigilanza territorialmente competente (ASL).

Chi lavora col gruppo 4 deve ricevere un'autorizzazione anche dal Ministero del Lavoro e delle Politiche Sociali e dal Ministero della Salute, su parere dell'Istituto Superiore di Sanità. Essa ha la durata di cinque anni ed è rinnovabile.

L'accertamento del venir meno di una delle condizioni previste per l'autorizzazione ne comporta la revoca (Art. 270, D. Lgs. 81/08).

Il Datore di Lavoro deve adottare specifici livelli di contenimento nei locali destinati agli animali trattati con gli agenti dei gruppi 2, 3 e 4. Tali livelli devono soddisfare i requisiti minimi per proteggere il personale e per impedire la contaminazione dell'ambiente circostante. Tutto ciò è specificato nell'Allegato XLVII del D. Lgs. 81/08.

I requisiti di progettazione, le attrezzature e le precauzioni aumentano, divenendo più restrittivi, procedendo dal livello di contenimento 2 al 4. Il livello superiore incorpora gli standard dei livelli inferiori.

Biosafety level (BSL)

Il livello di biosicurezza per le attività di laboratorio con uno specifico microrganismo non viene assegnato solo sulla base del gruppo di rischio dell'agente patogeno. Esso dipende dalla **valutazione del rischio**, dalle specifiche **lavorazioni** da svolgere, dalle **strutture** e attrezzature di cui si dispone e dalle **pratiche operative** necessarie per lavorare in sicurezza. I lavoratori devono essere informati e formati sui rischi per la salute e, quando necessario, se esposti ad agenti biologici devono essere sottoposti a sorveglianza sanitaria (D. Lgs. 81/08).

Risk Assessment e Risk Management (Colavita, 2018):

- 1) Identificare l'*hazard* e stilare un primo *risk assessment*, considerando le principali caratteristiche dell'agente biologico;
- 2) Identificare quali **procedure di laboratorio** verranno svolte;
- 3) Selezionare il *Biosafety Level (BSL)* appropriato;
- 4) Selezionare le **pratiche microbiologiche** appropriate;
- 5) Selezionare i Dispositivi di Protezione Individuale (**DPI**);
- 6) Selezionare le procedure di sicurezza necessarie per **prevenire** le *Laboratory Acquired Infections (LAIs)*.

Tabella 3: Legenda: BSL-1, BSL-2, BSL-3, BSL-4.

Livello di contenimento	Base, Elevato, Massimo
Tipo di laboratorio	Insegnamento di base, ricerca Diagnostica di base, ricerca Diagnostica specialistica, ricerca Patogeni pericolosi
Pratiche microbiologiche standard	NO fumo, cibo, bevande Prudenza con taglienti Manuale di sicurezza Registro incidenti ed esposizioni accidentali
Pratiche specifiche	Segnale di rischio biologico

	<p>Smaltimento dei rifiuti infettivi separato</p> <p>Programma di immunizzazione</p>
DPI standard	<p>Camice sterile</p> <p>Guanti</p> <p>Protezione per gli occhi (in alcune procedure)</p> <p>Copricapo</p> <p>Calzature apposite</p> <p>Copriscarpe</p> <p>DPI respiratoria (in alcune procedure)</p> <p><i>Tutti i DPI devono essere rimossi e decontaminati prima di lasciare il laboratorio.</i></p>
Attrezzature di biosicurezza	<p>Nessuna</p> <p>BSC-I/II per procedure che possono creare aerosol</p> <p>BSC-II per tutte le procedure</p> <p>BSC di classe III (<i>glove-box</i>)</p>
Requisiti di struttura non specifici	<p>Pavimenti e superfici di lavoro resistenti, impermeabili, facili da pulire e decontaminare</p> <p>Finestre sigillate, luce a intensità regolabile</p> <p>Controllo insetti e roditori</p> <p>Controllo temperatura</p> <p>Impianto di ventilazione, flusso pulito → sporco</p> <p>Allarmi per guasti</p> <p>Controllo accessi - persone autorizzate - supervisore</p> <p>Lavandino per le mani con hands-free operations</p> <p>Lavandino per gli occhi</p> <p>Doccia d'aria - acqua</p> <p>Porte con serratura</p> <p>Pass-box</p> <p>Autoclave - materiali, cibo, acqua</p> <p>Aria estratta filtrata con HEPA (consigliato)</p> <p>Aria immessa filtrata con HEPA</p>

Ulteriori specifiche sulle misure e sui livelli di contenimento sono elencate nell' Allegato XLVII del D. Lgs. 81/08.

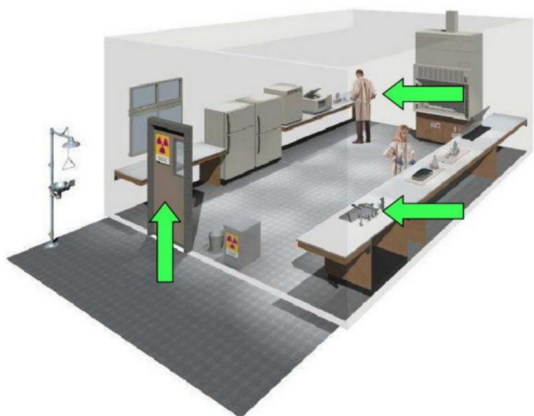


Figura 14: BSL-1. Colavita, 2018.

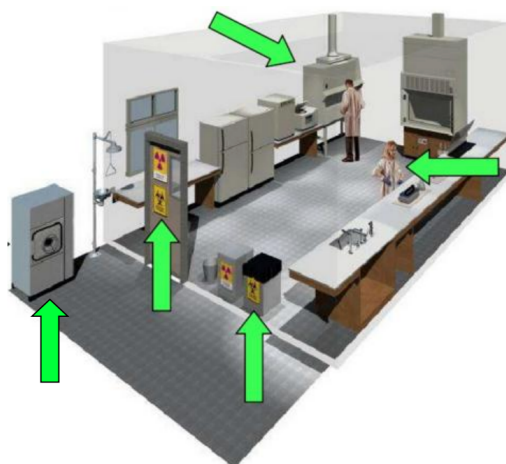


Figura 15: BSL-2. Colavita, 2018.

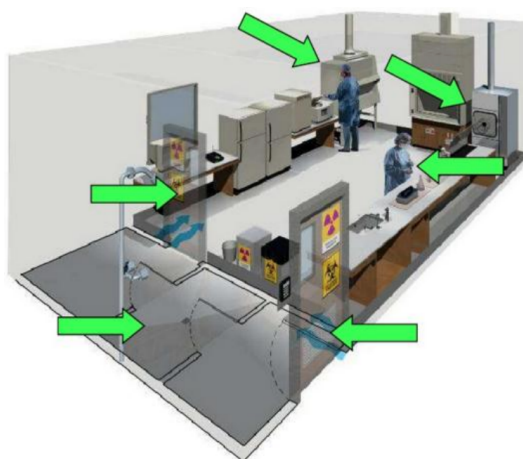


Figure 16 e 17: BSL-3. Colavita, 2018.

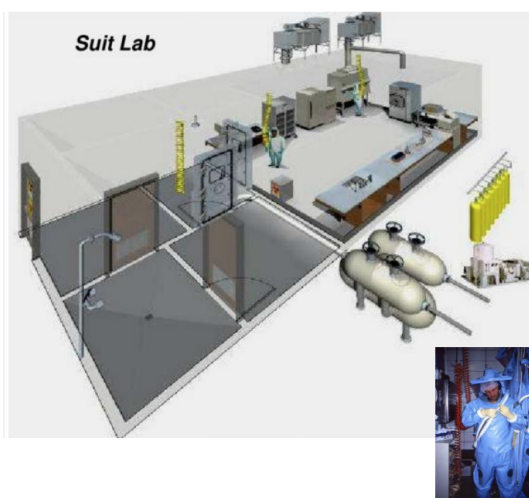


Figure 18 e 19: BSL-4. Colavita, 2018.

Microrganismi Geneticamente Modificati (MOGM)

Un gene *wild type* (**wt**) esprime il fenotipo naturale e non mutato per un determinato carattere, il più frequente in una popolazione selvatica.

Secondo il D. Lgs. 12 aprile 2001 n. 206, un microrganismo geneticamente modificato (**MOGM**) è “*un microrganismo il cui materiale genetico è stato modificato in modo non naturale, mediante moltiplicazione o ricombinazione naturale*”.

Per **impiego confinato** si intende ogni attività nella quale “*i microrganismi vengono modificati geneticamente o nella quale tali MOGM vengono messi in coltura, conservati, utilizzati, trasportati, distrutti, smaltiti o altrimenti utilizzati, e per la quale vengono usate misure specifiche di contenimento, al fine di limitare il contatto degli stessi con la popolazione o con l’ambiente.*”

Le sequenze di DNA esogeno (**transgeni**) inserite nel genoma di un animale si troveranno in tutte le sue cellule, inclusa la linea germinale, potendo quindi essere trasmesse alla progenie.

Il genoma umano è stato completamente sequenziato nel 2001 (NIH, 2001), quello murino nel 2002 (NIH; 2002): si è potuto osservare che uomo e topo hanno una grande somiglianza genetica e fisiologica. I topi transgenici sono pertanto utilizzati come modello animale allo scopo di studiare patologie umane, individuandone le cause e i possibili interventi terapeutici (Yue et al. - Mouse ENCODE Consortium, 2014).

Negli ultimi due decenni sono stati fatti continui progressi nella tecnologia del DNA ricombinante, con la realizzazione di grandi quantità di vettori artificiali utilizzati per il trasferimento genico tra specie differenti.

L’inoculazione di uno o più transgeni nel genoma ospite può essere effettuata attraverso varie **tecniche di transgenesi** (Rodinò et al., 2020):

- 1) Microiniezione di costrutti di **DNA esogeno** nel pronucleo di uno **zigote**;
- 2) Impiego di **vettori virali**;
- 3) Microiniezione di **cellule staminali** in blastocisti;
- 4) *Intracytoplasmic Sperm Injection*;
- 5) Impiego di **endonucleasi**.

Per verificare l’induzione della mutazione è necessario genotipizzare gli animali: si prelevano frammenti di tessuto (apice della coda, lembo dell’orecchio, ecc.) da

cui il DNA viene estratto e analizzato con tecniche che evidenzino la presenza del transgene, come la PCR.

L'utilizzo di MOGM rende necessaria un'adeguata valutazione dei rischi con conseguente adozione delle misure di sicurezza idonee (D.Lgs 206/2001).

All'interno del "Manuale relativo alla sicurezza nei laboratori che fanno uso di MOGM" (Sturchio et al., 2010) si trattano in maniera approfondita tali argomenti.

A differenza del D. Lgs. 81/08, dunque, non si classificano i MOGM, ma i loro impieghi previsti. Quindi, i livelli di contenimento da utilizzare e i controlli da effettuare saranno determinati dalla natura del gene da trasdurre e dal tipo di vettore utilizzato.

Il rischio può essere classificato in: **nullo** o trascurabile; **basso**; **moderato**; **alto**.

Zoonosi

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) definisce zoonosi *"tutte le malattie trasmissibili naturalmente dagli animali all'uomo e viceversa"*.

Le zoonosi sono un pericolo sanitario per il personale impiegato nello stabulario: gli animali da laboratorio sono ospiti potenziali di un gran numero di agenti causanti zoonosi.

Anche nei casi in cui gli animali siano certificati essere privi di patogeni, è sempre opportuno adottare tutte le misure di sicurezza necessarie a minimizzare il rischio zoonosi. Essi potrebbero infatti venire a contatto con colonie di roditori allevati con differenti standard di sicurezza, o con animali allevati nello stesso stabulario non sottoposti a screening regolari, con roditori selvatici o artropodi presenti durante il trasporto o penetrati accidentalmente nello stabulario.

Un ruolo fondamentale nella riduzione del rischio di contaminazione biologica e zoonosi è svolto dalla quarantena, dagli isolatori o dagli IVC, dai DPI.

I **Dispositivi di Protezione Individuale (DPI)** sono presidi volti a proteggere il lavoratore dai rischi propri degli ambienti di lavoro e delle attività che svolge. Essi devono essere conformi alle caratteristiche indicate nel D. Lgs. 475/92.

I DPI svolgono anche una funzione protettiva nei confronti degli animali, limitando le contaminazioni ai fini di preservare le unità microbiologiche.

- **Guanti**

Durante le operazioni di manipolazione degli animali è necessario utilizzare guanti monouso, in genere in lattice, nitrile o vinile. Essi vanno cambiati tutte le volte che si rompono e, per la salvaguardia degli animali, ogni volta che si maneggiano ceppi diversi o con standard sanitari differenti.

Le attività lavorative che comportano una deliberata esposizione ad agenti chimici e/o microrganismi patogeni prevedono l'uso di guanti conformi allo Standard EN ISO 374. Esso specifica i requisiti di resistenza chimica, resistenza alla penetrazione e alla permeazione.

- **Dispositivi per la protezione del corpo**

Indumenti quali camici, tute, copricapo, calzature, copriscarpe, ecc. conformi alla norma tecnica UNI EN 14126. Questa stabilisce i requisiti prestazionali e i metodi di prova per gli indumenti di protezione contro gli "Agenti Infettivi".

- **Dispositivi per la protezione del volto da liquidi biologici**

Dispositivi quali occhiali di protezione, maschere di protezione o equivalenti, conformi alla norma tecnica UNI EN 166.

- **Dispositivi per la protezione delle vie respiratorie**

Sono necessari per la protezione dall'inalazione di aerosol, polveri, nebbie e fumi contaminati e dall'esposizione a particelle allergizzanti in individui sensibilizzati. Un esempio sono i facciali filtranti: maschere a conchiglia dotate di particolari filtri di vario grado (es. FFP2).

Esempio di procedure operative che il personale effettua per l'accesso in stabulario:

- 1- Lavaggio mani;
- 2- Indossare vestiario pulito (maglia, pantaloni, calzini, cuffia);
- 3- Indossare copricapo monouso;
- 4- Indossare facciale filtrante;
- 5- Indossare tuta monouso;
- 6- Indossare scarpe pulite;
- 7- Indossare soprascarpe;
- 8- Indossare i guanti.

Togliere sempre guanti, tuta, copriscarpe e copricapo quando si esce dallo stabulario, eliminarli nell'apposito contenitore e lavarsi accuratamente le mani.

MATERIALI E METODI

Questa tesi si concentra sull'osservazione di una realtà che ha come fini la ricerca di base e traslazionale, le cui strutture e operazioni sono progettate in funzione di tutelare il più possibile il livello sanitario degli animali stabulati.

Altre modalità si utilizzano per lo studio delle malattie infettive, dove invece la priorità è impedire la diffusione dei patogeni dagli animali agli operatori e all'esterno delle strutture.

3. ANALISI DI UN MODELLO DI STABULARIO UNIVERSITARIO

Febbraio 2023

Lo Stabulario Universitario (S.U.) "A", mio oggetto di osservazione e studio, è uno stabulario classificato *Specific Pathogen Free* (SPF). La sua peculiarità è il fatto di trovarsi nello stesso edificio, all'estremità opposta dello stesso piano e senza alcun tipo di soluzione di continuità rispetto allo S.U. "B". All'interno di quest'ultimo è presente un'ampia gamma di microrganismi, ciononostante lo S.U. "A" ospita animali che alle analisi previste dal programma HM risultano negativi a tutti i patogeni. È evidente che la compresenza di due stabulari con uno stato sanitario così diverso può comportare molteplici criticità nella gestione del rischio, in particolare nel passaggio di microrganismi dallo S.U. "B" allo S.U. "A".

3.1 Stabulario Universitario "A"

Lo S.U. "A" è uno stabulario **barrierato** riservato all'allevamento di topi da sperimentazione di categoria **SPF**. In realtà, lo stabulario nasce come una struttura **semi-barrierata**: non vi è una separazione fisica dallo S.U. "B"; non è presente un sistema di filtrazione HEPA dell'aria circolante, ma questa è la stessa dell'ambiente esterno; non vi sono docce d'acqua; gli operatori non si vestono interamente con indumenti sterili monouso. Tuttavia, sono presenti alcune caratteristiche che elevano lo stabulario rispetto alla sua categoria. Innanzitutto, la **doccia d'aria**, il **pass-box** e il locale **disinfezione** creano una barriera di protezione tra l'esterno e l'interno dello stabulario. Dopodiché l'utilizzo di **IVC** e la manipolazione dei topi sotto **cappa** a flusso laminare **HEPA** garantiscono che ciascuna gabbia rappresenti un'unità microbiologica.

Gli animali che entrano nello S.U. "A" vengono forniti da ditte specializzate oppure acquisiti da altre istituzioni di ricerca. Essi sono predisposti geneticamente allo sviluppo delle patologie oggetto di studio da parte dei ricercatori (es. tumori; SLA; ecc.). I topi vengono spediti allo S.U. "A" accompagnati da *report* che attestino il loro stato di SPF e, per ulteriore precauzione, vengono alloggiati nell'area deputata alla **quarantena** per un tempo coerente con il loro livello di rischio. Se i fornitori degli animali non possono garantire di seguire le raccomandazioni FELASA sul monitoraggio sanitario, al loro arrivo i topi vengono sottoposti a delle **analisi** e sostano nell'area di quarantena in attesa dei risultati.

Il programma HM dello S.U. "A" prevede un'**analisi semestrale** dello stato sanitario delle sue **sentinelle**, la quale deve mostrare una **negatività** a tutti gli agenti ricercati negli animali perché lo stabulario possa mantenere il suo stato di SPF.

L'**accesso** allo S.U. "A" è riservato ai **tecnici** di laboratorio esperti che operano solo ed esclusivamente in quest'area, all'**RBA** e al **VD**. Gli utilizzatori, ovvero i ricercatori che richiedono ai tecnici di far riprodurre le linee di topi per ottenere i soggetti a loro necessari per i propri esperimenti, non possono entrare nello S.U. "A".

Lo stabulario è fornito di un **corridoio "pulito"** e di uno **"sporco"**. Le gabbie e i materiali puliti possono dunque essere mantenuti separati in maniera efficace da quelli sporchi e dai rifiuti. Questa disposizione elimina il potenziale di cross-contaminazione nei corridoi e rende i flussi di materiali più agevoli. Chiaramente, i due corridoi occupano più spazio e necessitano di più manodopera di un corridoio singolo.

È fondamentale che chiunque abbia l'autorizzazione ad accedere allo S.U. "A" rispetti le rigide **procedure operative standard (POS)** progettate durante la stesura del programma HM.

L'operatore accede alla struttura utilizzando il suo **badge** per superare la **prima porta** di ingresso. Qui calpesta dei tappeti adesivi, in prossimità dei quali lascia le sue calzature; supera la **seconda porta** di ingresso, sempre utilizzando il suo **badge**, e indossa delle nuove **calzature pulite**. L'operatore si dirige verso gli **spogliatoi**, dove dovrà spogliarsi dei suoi vestiti, riponendoli in armadi appositi, e indossare **pantaloni**, **maglia**, **calzini** e **cuffia** lavati in struttura. Deve poi indossare una **tuta monouso** provvista di **cappuccio**, una **mascherina chirurgica**,

nuove **scarpe pulite**, **due paia di calzari** e un paio di **guanti** che andranno fissati alle maniche della tuta utilizzando dello **scotch**. Una volta vestito, l'operatore deve eseguire la **doccia d'aria** per 30 secondi e poi può accedere alle aree di stabulazione degli animali. Qui indossa un nuovo paio di guanti ogni volta che manipola una fila diversa di un *Rack*, disinfettando gli stessi con alcool (70%) prima di toccare l'interno di ciascuna gabbia.

È importante che il **flusso di movimentazione continua** dall'area "pulita" a quella "sporca" venga costantemente mantenuto da persone e oggetti: chiunque esca dallo stabulario non può poi rientrare tornando indietro, ma deve ripetere tutto il giro, le procedure di vestizione e la doccia.

Qualunque **oggetto** in ingresso (compresi cibo, acqua, lettiera, ecc.) deve necessariamente essere lavato, nel **lavagabbie** o a mano, e **sterilizzato**, se possibile in **autoclave**. È importante considerare la capacità e i tempi del macchinario per organizzare al meglio le procedure di sterilizzazione. Il protocollo dello S.U. prevede cicli a **121°C per 20 minuti** per le **gabbie**, a 121°C per **30 minuti** per le **bottiglie**. I materiali devono essere disposti a una distanza tra loro sufficiente a garantire il raggiungimento delle temperature previste in tutti i punti, per questo l'autoclave non può essere riempita eccessivamente. I contenitori eventualmente usati devono permettere l'ingresso del vapore al loro interno.



Figura 20: Lavagabbie.
IWT S.r.l.



Figura 21: Autoclave.
*Polo Multifunzionale A. Vallisneri,
Università degli Studi di Padova.*

Il materiale non sterilizzabile in autoclave viene trattato chimicamente col **Virkon® S** in soluzione 1-3%. Si tratta di un virucida caratterizzato da uno spettro di attività biocida ampio e differenziato, rapidità di azione, tollerabilità e caratteristiche di sicurezza ecologica. Una volta **disinfettato**, il materiale entra in stabulario attraverso un **pass-box**, ovvero una struttura di passaggio presente nella parete del primo corridoio. Tale passaggio possiede una porta d'accesso rivolta verso il corridoio e una di uscita rivolta verso l'interno dello stabulario. L'aria immessa all'interno del pass-box viene filtrata HEPA, soffiata sugli oggetti e infine ri-aspirata e ri-filtrata prima dell'espulsione. Gli operatori della zona "pulita" possono dunque prelevare il materiale disinfettato senza dover uscire dallo stabulario, evitando di contaminarlo e contaminarsi.



Figura 22: pass-box. Polo Multifunzionale A. Vallisneri, Università degli Studi di Padova.

Lo stabulario è composto dalle seguenti stanze:

- **Tre stanze** destinate alla **stabulazione** degli animali;
- Un **laboratorio BSL-2**;
- Una **sala operatoria**;
- Una **sala per l'eutanasia**;
- Un **magazzino** interno;
- Una **sala di lavaggio** interna.

In ciascuna stanza di stabulazione sono presenti vari *Rack*. In particolare:

- Stanza 1: *Rack* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11
- Stanza 2: *Rack* 1, 2, 3, 4
- Stanza 4: *Rack* 1, 2, 3

Un *Rack* è un carrello composto da **9 file**, ognuna delle quali può contenere **8 gabbie**, che ospitano da **1 a 5 topi adulti** oppure una **madre** con la sua **cucciolata**, fino al momento dello svezzamento.

Ciascuna gabbia **IVC** è dotata del proprio circuito di ventilazione, il quale garantisce un'efficace protezione contro l'ingresso dei microrganismi e rappresenta un sistema di biocontenimento importante in caso di contagio. Se una gabbia viene inserita in maniera incompleta nello scaffale, dei sistemi di sicurezza visivi rendono evidente il problema, consentendo di correggere rapidamente la sua posizione e ripristinare il collegamento col sistema di aerazione.

La **pressione** viene mantenuta **positiva** all'interno delle gabbie per prevenire ulteriormente l'ingresso di microrganismi e tutelare la salute degli animali anche nel caso di comparsa di fessurazioni.

Il livello di biosicurezza adottato nello S.U. "A" è di tipo 2, poiché sono presenti dei patogeni potenzialmente trasmissibili all'uomo, ma con un rischio individuale moderato e uno collettivo basso. Oltretutto, il rischio di contaminazione è soprattutto di tipo oro-fecale, dunque tali agenti sono difficili da contrarre tramite aerosol in un ambiente di laboratorio. Considerando che il **BSL** è **2** e che l'uso di vettori virali per l'induzione di patologie non provoca mutazioni nell'uomo, i pericoli per i lavoratori dovrebbero essere limitati.

Nello S.U. "A" si usano delle **BSC-II** (filtro HEPA in entrata e in uscita) durante qualunque tipo di procedura sugli animali. L'aria in uscita dalle cappe, però, seppur filtrata HEPA, viene emessa all'interno della sala stessa e non eliminata direttamente fuori dell'edificio (cosa che avverrebbe in caso di BSL-3).

Una BSC deve essere posizionata lontano da porte, prese d'aria e zone trafficate. Gli utilizzatori devono indossare i DPI e accenderla 5 min prima di operare. Va verificata la presenza del flusso dell'aria, che le griglie siano libere, che vi siano a disposizione un disinfettante e un contenitore dei rifiuti pericolosi. Gli operatori devono prestare particolare attenzione affinché i loro movimenti siano confinati nello spazio sottostante la cappa a flusso laminare. Quando l'utilizzo di una BSC è terminato, si deterge e disinfetta la sua superficie con **candeggina** alternata ogni mese a **sali quaternari di ammonio**. Non si utilizza sempre lo stesso disinfettante, perché è una pratica che potrebbe favorire lo sviluppo di antimicrobico-resistenze all'interno dello stabulario. Infine, si disinfettano i guanti prima di riporli nei rifiuti. Andrebbero attesi altri 5 min prima di spegnere il macchinario.

3.2 Stabulario Universitario "B"

Lo Stabulario Universitario "B" è uno stabulario **convenzionale** riservato all'attuazione delle **procedure sperimentali** sugli animali. Qui gli animali giungono dallo S.U. "A", oppure vengono forniti da ditte specializzate o acquisiti da altre istituzioni di ricerca.

Dalle analisi microbiologiche effettuate semestralmente secondo il programma HM, risultano diverse **positività** a virus, batteri e parassiti.

Oltre ai tecnici, al VD e all'RBS, anche i **ricercatori** hanno **accesso** allo S.U. "B" e le misure di biosicurezza non sono così strettamente applicate come nello S.U. "A". Per esempio, il **flusso** di movimentazione segue un corridoio centrale e **non** è di tipo **continuo**, poiché nel corso degli anni si è visto che rispettare tale POS non fosse utile ad arginare la contaminazione microbiologica ormai avvenuta.

Le **gabbie** dello S.U. "B" **non** sono **chiuse** ermeticamente: la parte superiore della gabbia è la griglia metallica di contenimento, che funge anche da mangiatoia (la quale è presente anche nelle ICV dello S.U. "A", ma in quel caso si trova sotto al coperchio).

Le condizioni di stabulazione dei topi sono dunque evidentemente peggiori, fatto che si percepisce anche solo accedendo a entrambi gli stabulari e percependo un'aria meno respirabile allo S.U. "B", rispetto allo S.U. "A".

4. POSITIVITÀ A *Entamoeba* spp.

Inizialmente il mio lavoro doveva limitarsi alla stesura di osservazioni e ragionamenti su come fosse possibile mantenere separati due stabulari così differenti dal punto di vista microbiologico considerando la loro vicinanza spaziale, la trasmissibilità dei patogeni e la movimentazione di oggetti e operatori.

Durante la scrittura della mia tesi si è verificato però un episodio di contaminazione all'interno dello S.U. "A", che di seguito andrò a descrivere.

Marzo 2023

Dalle analisi **copromicroscopiche** effettuate **semestralmente** sulle sentinelle dello S.U. "A" da parte di una ditta specializzata, risultano delle **positività** a *Entamoeba* spp. nei *Rack* 10 e 11 della Stanza 1 e nei *Rack* 2, 3 e 4 della Stanza 2. I topi dello stabulario **non** presentano **manifestazioni cliniche** di malattia gastrointestinale, segni di sofferenza o malessere di alcun tipo. Nonostante ciò, la rilevazione di un patogeno durante le analisi è sufficiente a far **cadere** il **titolo** di stabulario **SPF**. È dunque interesse dell'Università **confermare** la **diagnosi**, scovare la **falla** nel sistema di **biosicurezza**, **risolvere** il problema, **eliminare** i topi **positivi** per ripristinare lo stato sanitario dello S.U. "A" e, al termine di tutto ciò, **controllare** che non vi siano effettivamente più individui positivi. Questo *iter* di eradicazione è necessario, poiché non si ha la certezza che il patogeno non sia effettivamente pericoloso per gli animali ed eventualmente per l'uomo. In secondo luogo, *Entamoeba* spp. potrebbe potenzialmente interferire con i progetti di ricerca, alterando i risultati degli studi e la riproducibilità degli esperimenti. Infine, se lo status qualitativo dello stabulario è caduto, con esso lo è anche la possibilità di fornire gli animali a chiunque li richieda proprio perché corollati dello stato di SPF.

4.1 *Entamoeba* spp.

I protozoi sono organismi eucarioti unicellulari che comprendono specie patogene e non patogene. *Entamoeba* spp. è un protozoo intestinale non flagellato che sopravvive al di fuori dell'ospite allo stadio di cisti. Il **ciclo** vitale è **diretto** e la trasmissione è di tipo **oro-fecale** (ingestione delle **cisti** presenti in cibo o acqua contaminati). Nell'intestino, la cisti si differenzia nella forma di trofozoita

attraverso un processo noto come excistamento. Il **trofozoita** è la forma **vegetativa** che si sviluppa all'interno di un organismo, motile, metabolicamente attiva e capace di nutrirsi. I trofozoiti si attaccano all'epitelio intestinale, dove effettuano una riproduzione asessuata. Essi possono andare incontro a incistamento, entrando nella fase di resistenza. Quando le cisti si liberano nelle feci, contaminano l'ambiente per completare il ciclo vitale del parassita. I trofozoiti possono rimanere nel tratto intestinale (nel 90% dei casi) o diffondersi negli organi dei tessuti molli come fegato, polmoni o cervello (Mendoza Cavazos et al., 2023).

Le cisti possono essere trovate nelle feci mediante tecniche di **flottazione** fecale ed esame **copromicroscopico**. La diagnosi non è sempre semplice, sia a causa della presenza di pseudo-parassiti, sia perché possono essere necessari vari campioni di feci per rilevare le oocisti e, anche quando questo accade, non è possibile distinguere la specie. La diagnosi si potrebbe effettuare anche mediante esame microscopico di un campione fresco di un **raschiato** della **mucosa** del tratto **intestinale** colpito. Più utile è la tecnica della **PCR**, con valutazione della presenza di materiale genetico dell'ameba nelle feci (Pritchett-Corning et al., 2012). L'identificazione dei parassiti dovrebbe procedere il più possibile fino al nome della specie.

In genere i protozoi che infestano il topo da laboratorio **non** sono **patogeni** e si ritiene che abbiano poco o nessun effetto sulla maggior parte delle ricerche. Se una colonia precedentemente negativa per tali organismi diventa positiva, ciò è indice di un problema con la biosicurezza. Il trattamento per questi parassiti non è raccomandato, piuttosto si considera l'eliminazione o il trasferimento degli individui positivi, oppure l'utilizzo di tecniche come la riderivazione (Pritchett-Corning et al., 2012).

- 1) ***Entamoeba muris***: è la più diffusa specie di protozoi enterici non patogeni nel topo da laboratorio ed è specie-specifica. Le cisti sferiche e i trofozoiti di questo parassita si rilevano nel **cieco** e, occasionalmente, nel colon dei topi. Le cisti (9–20 µm) possono essere più piccole dei trofozoiti (25 µm) (Pritchett-Corning et al., 2012); esse possiedono più di quattro nuclei (Mendoza Cavazos et al., 2023).

In letteratura esistono studi che rilevano un'elevata prevalenza di *Entamoeba muris* all'interno dei laboratori di sperimentazione animale (Bicalho et al., 2007).

- 2) *Entamoeba coli*: è uno dei protozoi non patogeni più comunemente presenti nel tratto intestinale umano, ma può colpire anche il topo (**zoonosi**). È distribuita a livello globale e la prevalenza più alta è stata segnalata nelle aree rurali e nelle regioni con scarse condizioni igienico-sanitarie (Stensvold et al., 2011).
- 3) *Entamoeba histolytica*: è tra i principali protozoi patogeni umani trasmessi dall'acqua. Essa provoca la **dissenteria amebica** o **amebiasi**, una grave malattia diarroica. Le cisti ingerite passano allo stato di trofozoita infestando il **colon** dell'individuo; infezioni secondarie più gravi possono realizzarsi anche in **cervello** e **fegato**. Dopo un periodo di crescita, in risposta al sistema immunitario e ai cambiamenti nell'intestino dell'ospite, i trofozoiti vanno incontro a incistamento. Gli individui infetti eliminano quindi le cisti nelle feci e possono continuare a farlo per anni senza mostrare i sintomi della malattia (Rubin et al., 1983). L'amebiasi è considerata endemica nelle regioni tropicali ed è associata a condizioni socioeconomiche e sanitarie inadeguate (Zanetti et al., 2021).
- 4) *Entamoeba dispar*: ha lo stesso aspetto di *E. histolytica*, ma è geneticamente diversa. Può causare lesioni intestinali focali negli animali da laboratorio. Nell'uomo invece è considerata un commensale stabile che produce uno stato di portatore asintomatico, anche se attualmente alcuni autori discutono la capacità di questa specie di provocare danni all'intestino e al fegato. È più diffusa a livello mondiale rispetto a *E. histolytica* (Zanetti et al., 2021).

A livello globale, la prevalenza complessiva di *Entamoeba* spp. nell'uomo è del 3,5%, di cui *Entamoeba histolytica* ed *Entamoeba dispar* rappresentano l'81,7%, nelle infezioni documentate. Nella popolazione brasiliana è stata riscontrata una prevalenza ancora più elevata (22%) di *Entamoeba* spp., con questa distribuzione: *Entamoeba coli* 86,5%, *Entamoeba dispar* 7,9% ed *Entamoeba histolytica* 3,1% (Zanetti et al., 2021).

4.2 Indagine microbiologica

4 aprile 23

Si procede con un controllo interno per la conferma della positività per *Entamoeba* spp. Si richiedono la collaborazione dell'Azienda Ospedaliera di Padova e quella dell'Unità Operativa di Parassitologia (U.O.) e Malattie Parassitarie del Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute dell'Università degli Studi di Padova (MAPS).

Il controllo interno è organizzato in questo modo:

1) Si raccolgono 35 *pool* (7 *pool* / *Rack* x 5 i *Rack* positivi): ciascun *pool* deve essere costituito da almeno 20 g di feci prelevate da 10 gabbie, cercando di prelevarne in maggior quantità dalle gabbie che ospitano un maggior numero di animali;

2) Ogni *pool* deve essere omogeneo, ovvero le feci devono essere mescolate per evitare stratificazioni del campione;

3) Si costituiscono due aliquote:

- Una da conservare in liquido fissativo in rapporto 3 parti di liquido e 1 parte di feci e inviare all'Az. Osp. di Padova;
- Una da conservare in una provetta Falcon a 4°C e inviare al Laboratorio di Parassitologia entro 24 ore.

4) Si effettuano le analisi di laboratorio delle rispettive aliquote:

- U.O. di Parassitologia: esame copromicroscopico.
- Az. Osp.: esame copromicroscopico e molecolare.

Presso l'Az. Ospedaliera di Padova vengono eseguite PCR per *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* e *Dientamoeba fragilis*, che risultano negative. Al momento non sono a disposizione PCR per l'identificazione di *Entamoeba coli* ed *Entamoeba muris*.

Anche dal Laboratorio di Parassitologia viene confermata una positività attraverso l'esame copromicroscopico: in particolare, nelle analisi del primo *pool* (*Rack* 10) vengono trovate oocisti e trofozoiti compatibili con *Entamoeba* spp. La specie non è identificabile con questa tipologia di esame.

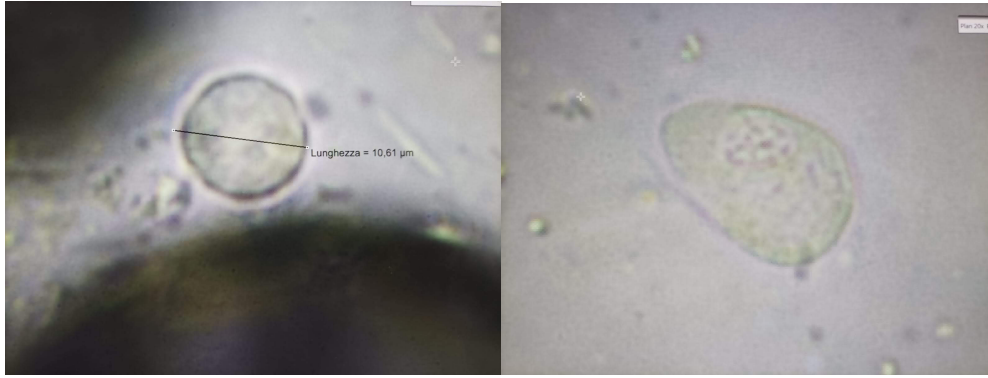


Figure 23 e 24: oocisti (sinistra) e trofozoita (destra) di *Entamoeba* spp., ingrandimento 60X, gentilmente concesse dal *Laboratorio di Parassitologia del dipartimento di MAPS*.

I sospetti principali al momento sono *Entamoeba muris* ed *Entamoeba coli*. Si pensa di poter escludere la presenza di *Entamoeba dispar*, ma soprattutto di *Entamoeba histolytica*, poiché la loro patogenicità dovrebbe provocare evidenti segni clinici negli animali. Tra l'altro, se si trattasse della seconda ci si troverebbe in grande stato di allerta data la sua pericolosità per l'uomo.

4.2.1 Ipotesi sulla causa di contaminazione

Al di là dell'identificazione della specie in questione, si elaborano delle ipotesi su come *Entamoeba* spp. sia potuta entrare nello stabulario.

- 1) Tramite ingresso di **topi infetti** / portatori all'interno dello stabulario.
- 2) Tramite contaminazione da parte di un **operatore infetto** che non ha rispettato tutte le misure di biosicurezza es. utilizzo dei servizi igienici e mancato lavaggio delle mani, rottura di un guanto, ecc.
- 3) Tramite contaminazione dell'**acqua** potabile dell'acquedotto e successiva inefficiente sterilizzazione di quest'ultima in autoclave.

1) La prima ipotesi tenderebbe a essere scartata, poiché gli animali che entrano allo S.U. "A" sono corredati di un *report* sanitario estremamente rigoroso che attesta il loro stato di SPF. Se anche questo *report* non fosse veritiero, gli animali verrebbero comunque fatti sostare nella zona di quarantena in attesa dei risultati dei test interni o della manifestazione clinica di eventuali segni di malattia.

2) La seconda ipotesi è poco probabile nel contesto dello S.U. "A", considerando professionalità ed esperienza degli operatori, perché presupporrebbe:

- Che un operatore sia un portatore di *Entamoeba* spp.;
- Che non rispetti le norme igieniche;
- Che non rispetti le POS.

3) Per quanto riguarda invece la terza ipotesi di contaminazione, si considera che il parametro cloro residuo, ovvero la quantità di disinfettante presente in acqua al momento dell'analisi (D. Lgs. 31/2001), ha un valore massimo consigliato di 0.2 mg/L. Per eliminare tutte le cisti di *Entamoeba* spp. a 22°C in 20 minuti sarebbero necessari tra i 2.0 e i 5.1 mg/L di residui di cloro, ovvero dalle 10 alle 50 volte in più (Rubin *et al.*, 1983). Quindi, se dovessero esserci per esempio dei tubi poco utilizzati con ristagno di acqua, ingresso, proliferazione e disseminazione di *Entamoeba* spp. nel sistema acqueduttale, questa non potrebbe essere poi eliminata dalla clorazione comunale.

È la Regione Veneto che, avvalendosi dei Servizi Igiene degli Alimenti e Nutrizione (SIAN) delle Az. Ulss ha il compito di tutelare la salute pubblica garantendo la qualità delle acque mediante l'applicazione e il rispetto delle normative sanitarie specifiche (D. Lgs. 31/2001). I protozoi appartengono però alla categoria "parametri accessori", spetta perciò all'ASL competente decidere se e come effettuare la loro ricerca (Art. 8, comma 3).

Se l'*Entamoeba* in questione fosse oggetto di ricerca, sarebbe utile richiedere al SIAN di fornire i risultati delle ultime analisi dell'acqua svolte. Sia *Entamoeba coli* che *Entamoeba muris*, però, non sono considerate di rilevanza sanitaria per l'uomo: la prima per il suo basso potere patogeno, la seconda perché è specie-specifica del topo. Le analisi del SIAN non sono perciò utili ai fini dell'indagine.

Nello S.U. "A" non è presente un sistema di clorazione: l'unico modo per eliminare i patogeni presenti in acqua, compresa *Entamoeba* spp., è attraverso la sterilizzazione in autoclave delle bottiglie contenenti acqua (121°C per 30 minuti). Se ci fosse dunque un malfunzionamento del macchinario o un erroneo posizionamento degli oggetti all'interno della stessa, può essere che il microrganismo non sia inattivato.

È necessario svolgere un'indagine per verificare il regolare funzionamento dell'autoclave.

5 aprile 2023

Vengono effettuati dei test sull'autoclave per rilevare eventuali malfunzionamenti e criticità nell'operazione di sterilizzazione.

Si consideri che la sterilità di un prodotto è definita dalla **probabilità** della presenza di microrganismi vitali sul prodotto dopo la procedura di sterilizzazione. Questa probabilità viene indicata come livello di garanzia di sterilità o *Sterility Assurance Level (SAL)* (Sastri, 2014).

- 1) Si inseriscono in autoclave degli indicatori biologici BIONOVA® (BT20/5). Questo bioindicatore è una provetta di plastica contenente una fiala di vetro provvista di un terreno di coltura e di un dischetto di carta assorbente con spore di *Geobacillus stearothermophilus*. Il SAL è di $2,0 \times 10^6$.
- 2) Vengono testate le due tipologie di ciclo di sterilizzazione utilizzate in stabulario (ciclo per bottiglie e ciclo per gabbie).
- 3) Al termine di un ciclo vengono prelevate le provette e si frantumano le fiale in vetro, assicurandosi che il disco con le spore sia lavato via dal terreno di coltura.
- 4) I bioindicatori sono incubati per 48 ore a 55-60°C. La crescita dei microrganismi si osserva dal cambiamento di colore del terreno da viola a giallo.
- 5) All'analisi delle piastre si conferma che le **spore** sono state completamente **eliminate**, dimostrando che il macchinario **funziona** perfettamente.



Figura 25: BIONOVA BT20/5 ampoule bioassays. www.terraviva.com.

Si misura la **temperatura** all'interno dei contenitori posti in autoclave durante il suo azionamento. Dentro le bottiglie, la temperatura **non raggiunge** i **valori minimi** sufficienti a garantire la **sterilizzazione**!



Figure 26 e 27: bottiglie in autoclave. IWT S.r.l.

Le bottiglie utilizzate per abbeverare i topi vengono poste all'interno di quelle che un tempo erano le gabbie dei ratti, che successivamente all'eliminazione di questi ultimi dai programmi sperimentali dello stabulario hanno iniziato ad essere utilizzate come contenitore.

La disposizione delle bottiglie nelle ex gabbie dei ratti non consente però il raggiungimento delle temperature previste dai programmi di sterilizzazione in autoclave all'interno delle bottiglie stesse.

L'**errore procedurale** è stato dunque individuato. Vi si pone rimedio semplicemente eliminando l'utilizzo delle ex gabbie dei ratti come contenitore delle bottiglie.

Ipotizzando che il problema di sterilizzazione dell'acqua sia stato risolto, a questo punto si procede con un programma di eradicazione del parassita nello stabulario. La conferma della positività nei *Rack* da cui era emersa la contaminazione già dal monitoraggio sulle sentinelle rende necessario proseguire con le indagini anche nelle gabbie dei *Rack* risultati negativi allo stesso monitoraggio, per poter garantire un'efficace eradicazione.

5. PROGRAMMA DI ERADICAZIONE

Maggio, giugno e luglio 2023:

- 1) **Elaborare** una PCR per l'identificazione di *Entamoeba* spp. e la specie di appartenenza;
- 2) Testare **tutte** le **gabbie** presenti all'interno dello stabulario, considerando che un *pool* (una provetta Falcon) debba contenere campioni fecali di una fila di gabbie;
- 3) Rilevare le **positività**, dunque le **file** che contengono gabbie con animali positivi;
- 4) **Eliminare** o trasferire tali animali allo S.U. "B";
- 5) **Ripetere** periodicamente le analisi per confermare l'eradicazione.

5.1 Preparazione del campione

- **Un campione** è rappresentato da una provetta Falcon contenente le feci raccolte dalle gabbie presenti in **una fila** di un *Rack*, considerando di raccogliere almeno 20 pellet fecali per gabbia;
- Svuotare il contenuto di una Falcon in una navicella, rabboccare con **acqua distillata** in modo tale da diluire il campione e lasciare ammolare le feci;
- **Schiacciare** le feci utilizzando un pestello;
- **Filtrare** il tutto in una nuova provetta, con l'ausilio di un imbuto e di un colino;
- Mettere la provetta a **centrifugare** a 1900 rpm;
- Eliminare il surnatante e conservare il **sedimento** in frigo a 4°C fino al suo successivo utilizzo, per procedere con l'estrazione del DNA.

5.2 Estrazione del DNA

I campioni sono sottoposti a estrazione del DNA utilizzando il kit commerciale *NucleoSpin Tissue Kit* (Macherey-Nagel), seguendo il protocollo indicato dalla Ditta produttrice.

Per verificare la bontà dell'estrazione e l'assenza di inibitori, durante la fase di lisi sono aggiunti 10 µl di *internal control* DNA diluito 1:10 presente nel QuantiNova Pathogen +IC Kit (Qiagen).

5.3 Amplificazione del controllo interno

Tutti i campioni sono sottoposti a una prima fase di **screening** mediante **real-time PCR** utilizzando QuantiNova IC Probe Assay presente nel QuantiNova Pathogen +IC Kit (Qiagen). In questo mix sono presenti tutti i reagenti necessari, primer e sonda oligonucleotidica marcata con MAX™ dye per verificare la presenza del **controllo interno** e quindi la bontà dell'estrazione.

Le prove vengono eseguite con lo strumento LightCycler® 96 *Real-Time PCR System* (Roche Diagnostics corporation).

Brevemente, per ciascun campione è preparata una soluzione contenente 1X QuantiNova IC Probe Assay (Qiagen) e 2 µl di DNA estratto in un volume di reazione finale di 10 µl. Le condizioni di amplificazione prevedono 40 ripetizioni del ciclo caratterizzato da una fase di denaturazione a 95°C per 5 secondi e da una di *annealing* ed estensione a 60° C per 30 secondi, precedute da un ciclo di attivazione dell'enzima a 95°C x 2 minuti.

Le analisi dei risultati sono condotte con il software *LightCycler 96 1.1 software*.

5.4 Ricerca di *Entamoeba* spp.

Tutti i campioni sono sottoposti ad **amplificazione** del **gene 18s rRNA** (1 kb di dimensione stimata) mediante **end-point PCR** utilizzando come primer le sequenze descritte da Mendoza Cavazos et al., 2023.

Le sequenze oligonucleotidiche dei *primer* sono elencate nella *Tabella A*.

Tabella A: Primer utilizzati per il rilievo della presenza di *Entamoeba* spp.

Primer	Gene target	Sequenza (5'-3')
PanEnt F	18s rRNA	AGATACCGTCGTAGTCCT
PanEnt R	18s rRNA	ACGACTTCTCCTTCCTCTAA

Le reazioni di amplificazione vengono eseguite nel termociclatore 2720 *Thermal Cycler* (Life Technologies Corporation) in un volume di reazione finale di 30 µl. L'amplificazione è eseguita utilizzando *Platinum Taq DNA polymerase* (Life Technologies Corporation, California, USA). La miscela di reazione è composta da 1X *Buffer*, 0.2 mM di ciascun *nucleotide trifosfato*, 1.5 mM di MgCl₂, 0.2 µM di ciascun *primer*, 1 U di *Platinum® Taq DNA polymerase* e 3 µl di DNA estratto. Il profilo di amplificazione prevede 40 ripetizioni del ciclo caratterizzato da una

fase di denaturazione a 94°C per 30 secondi, una fase di *annealing* a 58-54°C (*touch down* di 0.5°C/*cycle* per i primi 8 cicli) per 30 secondi e una di estensione a 72°C per 1 minuto, preceduto da una fase di attivazione dell'enzima a 94°C per 2 minuti.

Ad ogni reazione vengono aggiunti un **controllo positivo** fornito dall'Az. Osp. di Padova e un **bianco di reazione**.

I prodotti di PCR sono separati mediante elettroforesi su gel di agarosio 2% (w/v) in *Buffer* TBE 1X (Tris 90 mM, acido borico 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8) con l'aggiunta di 0.1 µl/ml (v/v) di *SybrSafe*TM *DNA Gel Stain* (Life Technologies Corporation). Le bande vengono visualizzate con il transilluminatore *Gel Doc*TM (BioRad) e, per verificare le dimensioni degli amplificati, ad ogni corsa elettroforetica si aggiunge *DNA Ladder 100 bp* (Thermo Fisher Scientific) come marcatore di peso molecolare.

Prima di procedere al sequenziamento nucleotidico, i prodotti di PCR sono purificati utilizzando il kit commerciale ExoSAP-ITTM (Applied Biosystems) secondo le specifiche fornite dalla Ditta produttrice.

Gli **amplificati purificati** vengono fatti **sequenziare** in entrambe le direzioni, usufruendo del servizio esterno fornito da MacroGen (Italy).

Gli elettroferogrammi delle sequenze ottenute, sia in *forward* sia in *reverse*, sono letti separatamente e poi assemblati al fine di ottenere una sequenza consenso. L'analisi e l'assemblaggio dei cromatogrammi sono eseguiti utilizzando il *software ChromasPro*, v1.42 (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Australia). È poi eseguita una ricerca per similarità delle sequenze consenso con i dati disponibili in *Genbank* utilizzando il server BLAST.

RISULTATI

Tutti i 153 campioni sono risultati positivi alla *real-time* PCR volta a valutare la bontà dell'estrazione del DNA e l'assenza di inibitori mediante la ricerca del controllo interno.

Tutti i campioni sono stati quindi sottoposti a *end-point* PCR per la ricerca di *Entamoeba* spp. e 5 sono risultati **positivi: 25, 36, 50, 79, 132** (vedi *Tabella B*).

Il sequenziamento nucleotidico e confronto con le sequenze depositate nella **Banca Dati GenBank** di tali campioni hanno confermato *Entamoeba* spp. per i campioni **25** (St2-R3 fila 7) e **132** (St4-R1 fila 2), mostrando un'identità di sequenza del **92%** con la sequenza avente come ID: AB445018.1, cioè quella corrispondente a *Entamoeba muris*.

I campioni **36, 50, 79** (rispettivamente St1-R11 fila 9, St1-R4 fila 8 e St1-R9 fila 2) restano dubbi, poiché non è stato possibile ottenere delle sequenze idonee a causa della presenza di amplificati aspecifici.

L'identificazione della specie di *Entamoeba* spp. è ancora in corso mediante amplificazione e sequenziamento di geni specie-specifici.

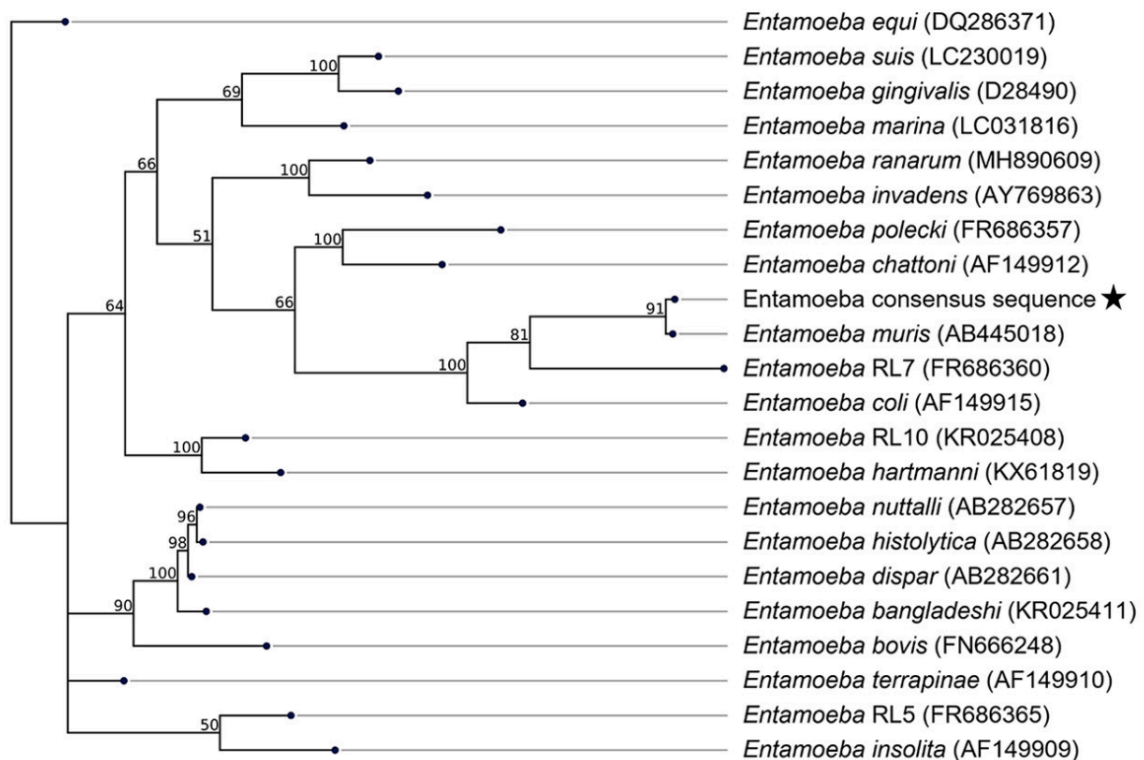


Figura 28: Filogenesi dell'rRNA 18S di *Entamoeba* spp. *Mendoza Cavazos et al., 2023.*

Tabella B: risultati della PCR e del sequenziamento svolti sui 153 campioni.

N	Sacchetto	Stanza	Rack	File	PCR	sequenziamento
1	1	2	2	1		
2	1	2	2	2		
3	1	2	2	3		
4	1	2	2	4		
5	1	2	2	5		
6	1	2	2	6		
7	1	2	2	7		
8	1	2	2	8		
9	1	2	2	9		
10	2	2	1	1		
11	2	2	1	2		
12	2	2	1	3		
13	2	2	1	4		
14	2	2	1	5		
15	2	2	1	6		
16	2	2	1	7		
17	2	2	1	8		
18	2	2	1	9		
19	3	2	3	1		
20	3	2	3	2		
21	3	2	3	3		
22	3	2	3	4		
23	3	2	3	5		
24	3	2	3	6		
25	3	2	3	7	pos	pos
26	3	2	3	8		
27	3	2	3	9		
28	4	1	11	1		
29	4	1	11	2		
30	4	1	11	3		
31	5	1	11	4		
32	5	1	11	5		
33	5	1	11	6		
34	5	1	11	7		
35	5	1	11	8		
36	5	1	11	9	pos	dubbio
37	6	1	3	1		
38	6	1	3	2		
39	6	1	3	3		
40	6	1	3	4		
41	6	1	3	6		
42	6	1	3	7		
43	6	1	3	8		
44	6	1	3	9		
45	7	1	4	3		
46	7	1	4	4		
47	7	1	4	5		
48	7	1	4	6		
49	7	1	4	7		
50	7	1	4	8	pos	dubbio
51	8	1	7	1		
52	8	1	7	2		
53	8	1	7	3		
54	8	1	7	4		
55	8	1	7	5		
56	8	1	7	6		

N	Sacchetto	Stanza	Rack	File	PCR	sequenziamento
57	8	1	7	7		
58	8	1	7	8		
59	8	1	7	9		
60	9	1	10	1		
61	9	1	10	2		
62	9	1	10	3		
63	9	1	10	4		
64	9	1	10	5		
65	9	1	10	6		
66	9	1	10	7		
67	9	1	10	8		
68	9	1	10	9		
69	10	1	1	1		
70	10	1	1	2		
71	10	1	1	3		
72	10	1	1	4		
73	10	1	1	5		
74	10	1	1	6		
75	10	1	1	7		
76	10	1	1	8		
77	10	1	1	9		
78	11	1	9	1		
79	11	1	9	2	pos	dubbio
80	11	1	9	3		
81	11	1	9	4		
82	11	1	9	5		
83	11	1	9	6		
84	11	1	9	7		
85	11	1	9	8		
86	11	1	9	9		
87	12	2	4	1		
88	12	2	4	2		
89	12	2	4	3		
90	12	2	4	5		
91	12	2	4	6		
92	12	2	4	7		
93	12	2	4	8		
94	12	2	4	9		
95	13	1	2	1		
96	13	1	2	2		
97	13	1	2	3		
98	13	1	2	4		
99	13	1	2	5		
100	13	1	2	6		
101	13	1	2	7		
102	13	1	2	8		
103	13	1	2	9		
104	14	1	5	1		
105	14	1	5	2		
106	14	1	5	3		
107	14	1	5	4		
108	14	1	5	5		
109	14	1	5	6		
110	14	1	5	7		
111	14	1	5	8		
112	14	1	5	9		

N	Sacchetto	Stanza	Rack	File	PCR	sequenziamento
113	15	1	6	1		
114	15	1	6	2		
115	15	1	6	3		
116	15	1	6	4		
117	15	1	6	5		
118	15	1	6	6		
119	15	1	6	7		
120	15	1	6	8		
121	15	1	6	9		
122	16	1	8	1		
123	16	1	8	2		
124	16	1	8	3		
125	16	1	8	4		
126	16	1	8	5		
127	16	1	8	6		
128	16	1	8	7		
129	16	1	8	8		
130	16	1	8	9		
131	17	4	1	1		
132	17	4	1	2	pos	pos
133	17	4	1	3		
134	17	4	1	4		
135	17	4	1	5		
136	17	4	1	6		
137	17	4	1	7		
138	17	4	1	8		
139	17	4	1	9		
140	18	4	2	4		
141	18	4	2	5		
142	18	4	2	6		
143	18	4	2	7		
144	18	4	2	8		
145	18	4	2	9		
146	19	4	3	1		
147	19	4	3	2		
148	19	4	3	3		
149	19	4	3	5		
150	19	4	3	6		
151	19	4	3	7		
152	19	4	3	8		
153	19	4	3	9		

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Due campioni sono sicuramente positivi a *Entamoeba* spp.

I tre campioni dubbi vengono considerati positivi, in via assolutamente preventiva, ai fini di perseguire la miglior strategia in materia di biosicurezza all'interno dello stabulario.

Misure adottate

- 1) Sia i topi positivi che quelli dubbi alla PCR vengono trasferiti nello S.U. "B" convenzionale.
- 2) A fine agosto si effettua una raccolta delle feci dei topi sentinella di ciascun *Rack* per monitorare il loro stato di salute. Sarebbe ottimale che questi controlli confermassero la positività dei *Rack* che comprendono le file risultate positive alle PCR e la negatività di tutti gli altri.
- 3) Dopo queste ultime analisi molecolari, i topi sentinella vengono eliminati.
- 4) Vengono inseriti nuovi topi sentinella in ogni *Rack*. Questi verranno analizzati in occasione del classico monitoraggio semestrale dello stabulario che, se tutto va come previsto, dovrebbe tornare ad essere SPF. Ai fini del rapporto HM, un'unità può essere segnalata come negativa per un agente infettivo se questo non viene rilevato dopo un periodo di 18 mesi (Pritchett-Corning *et al.*, 2014).

Limiti dei programmi di monitoraggio sanitario:

- 1) Raramente i campionamenti sono effettuati esattamente nel momento in cui un agente entra in una struttura e inizia a infettare gli animali. Questo intervallo di tempo consente all'agente di diffondersi ben prima di essere rilevato (Pritchett-Corning *et al.*, 2014).
- 2) Si presuppone che tutti gli agenti patogeni eventualmente presenti in una colonia vengano trasferiti in modo efficiente alla lettiera delle sentinelle e che ciò provochi un'infezione. Tuttavia, l'uso di IVC ha messo in discussione questo approccio, poiché la trasmissione di agenti infettivi attraverso la lettiera sporca è variabile e non sempre sufficiente (Scavizzi, F. *et al.*, 2021).

Può essere, dunque, che dall'analisi delle sentinelle risultino delle false negatività. Questo però si potrà eventualmente osservare solo durante analisi successive.

- 3) I requisiti di gestione degli animali in uno stabulario deputato all'allevamento rendono difficile un rigoroso isolamento delle colonie, seppur ospitate in gabbie IVC. In questo caso l'unità microbiologica, che dovrebbe essere rappresentata da una IVC, potrebbe identificarsi invece con una fila o addirittura con un *Rack* intero. Le stesse sentinelle vengono infatti assegnate per *Rack*.

Dunque, durante la ricerca di *Entamoeba* spp. si è considerato che un pool fosse una fila di gabbie.

Durante il monitoraggio delle sentinelle, invece, un pool è costituito da un *Rack*.

Criticità nelle operazioni di gestione della contaminazione:

- La conferma della negatività di tutti gli animali si otterrà solo in occasione del monitoraggio semestrale che avverrà sei mesi dopo l'immissione delle nuove sentinelle in stabulario. Nel frattempo, è bene mantenere un atteggiamento precauzionale durante la manipolazione dei topi, per evitare di incorrere in ulteriori contaminazioni di animali.
- L'impossibilità di definire la specie di *Entamoeba* spp. in questione obbliga gli operatori ad agire con ulteriore cautela, nel caso in cui dovesse trattarsi di un microrganismo causa di zoonosi.
- La contaminazione dello S.U. "A" è stata rilevata a marzo del 2023. L'organizzazione di un piano di eradicazione è stata molto lenta, poiché era la prima volta che un microrganismo entrava in stabulario e non si sapeva ancora come gestire i monitoraggi, come progettare nuovi metodi diagnostici, come creare una rete di collaborazione efficiente tra S.U. "A", U.O. di Parassitologia e Az. Osp. di Padova.
- Sarebbe utile, da un punto di vista di gestione della standardizzazione microbiologica tra stabulari, che esistessero imposizioni e leggi che indichino come svolgere le procedure all'interno dello stabulario in maniera più precisa e vincolante. Se così fosse, si eviterebbe di incorrere

in errori procedurali come l'inserimento delle bottiglie all'interno delle gabbie durante la sterilizzazione. Nella realtà però questo è irrealizzabile: la disomogeneità strutturale e la diversità nella tipologia di infrastrutture e macchinari dei vari stabulari rende impossibile che ciò avvenga. Al massimo si può auspicare il rispetto di linee guida indicative e raccomandazioni. Inoltre, se si legiferasse su procedure nella realtà inapplicabili, ciò potrebbe indurre all'abitudine da parte degli operatori di lavorare non rispettando quelle che sì, invece, sono disposizioni obbligatorie.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio l'Organismo Preposto al Benessere degli Animali dell'Università degli Studi di Padova e il suo Presidente, il professor Antonio Rosato, per avermi autorizzato a entrare nella realtà per me nuova dello stabulario, che ero tanto curiosa di conoscere.

Ringrazio il Polo multifunzionale A. Vallisneri per avermi consentito di partecipare attivamente alle indagini microbiologiche degli ultimi mesi.

Ringrazio tutti gli operatori che ho conosciuto al suo interno: mi hanno mostrato e spiegato il loro lavoro, mi hanno insegnato a orientarmi e operare nello stabulario, per poi "adottarmi" durante il piano di eradicazione. Grazie per avermi accolto con la vostra gentilezza e i vostri sorrisi (nascosti dai DPI).

Ringrazio il Responsabile del Benessere Animale dell'Università degli Studi di Padova, nonché il mio Correlatore, il dottor Carlo Zatti.

È stato per me una guida amica, sempre disponibile a coinvolgermi nelle sue attività con la sua bontà e pazienza.

Ringrazio il Servizio Veterinario Centralizzato di Ateneo, per avermi concesso di muovere i primi passi negli stabulari, stimolando il mio interesse e spingendomi quindi a decidere di proseguire in questo percorso.

Ringrazio l'Unità Operativa di Parassitologia e Malattie Parassitarie del Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute dell'Università degli Studi di Padova, per avermi considerato sempre parte attiva del piano di eradicazione, permettendomi di vivere a pieno un percorso di diagnosi parassitologica.

In particolare, voglio ringraziare la dottoressa Cinzia Tessarin e la dottoressa Giorgia Dotto. Siete state per me un porto sicuro di apprendimento, mi avete spiegato con grande chiarezza come organizzare tutte le fasi dell'indagine e come lavorare in laboratorio, dandomi grande considerazione e facendomi sentire sempre ben accolta. Grazie per il vostro cuore e la vostra simpatia!

Infine, ma solo perché non vorrebbe, ringrazio il mio Relatore, il Professor Alessandro Zotti. Innanzitutto, perché è la causa dei ringraziamenti precedenti. Mi sono presentata da Lei con una misera idea di che cosa fosse il mondo degli

animali da laboratorio e con il desiderio di scoprirlo. Lei ha subito ricavato per me uno spazio di osservazione e apprendimento, che si è poi trasformato in un'opportunità di partecipazione attiva e ragionamento. La ringrazio per essersi fidato di me, lasciandomi agire con estrema indipendenza e facendo sì che potessi assumermi le mie responsabilità, pur mantenendosi sempre disponibile ogni volta che avessi bisogno di un confronto, accompagnandomi con le Sue sincere e determinanti considerazioni.

Posso dire di sentirmi davvero soddisfatta di essere stata una Sua tesista.

A mia madre Sonia,

Per avermi trasmesso il senso di responsabilità nei confronti della mia meravigliosa vita e la leggerezza dei tuoi momenti migliori.

A mio padre Gabriele,

Per avermi circondato dell'amore per tutte le arti e le scienze, sempre condito dalle stranezze più interessanti.

A mia nonna Anna Maria,

Per crederti sempre giovane e dimostrarmi che non si deve smettere di imparare mai, per avermi trasmesso la passione per la cucina e per il cambiamento.

Grazie a te so che la cosa più importante è coltivare la serenità del proprio spirito.

A mia sorella Ginevra,

Mia compagna di giochi e condivisione, lontana, ma sempre vicina, per esserci quando solo tu puoi capire.

A mia sorella Beatrice,

Donna indipendente e forte, mi hai insegnato che essere dolci non significa essere deboli.

A mia sorella Virginia,

Per avermi mostrato che si deve sempre sperare nella comprensione e nel cambiamento.

A mia nipote Isotta,
Per la tua gioiosa e simpaticissima energia.

A mia zia Liliana,
Per avermi trasmesso il dono di saper sognare, girovagare e soprattutto essere se stessi, meglio se un po' matti.

A mio zio Jimmy,
Per la bontà con cui fai ogni cosa e la genialità della tua improvvisazione.

A Elena, la mia quinta sorella,
Per la tua determinazione, la tua simpatia, la tua essenza pura e onesta.
Per esserci sempre stata e aiutarmi a ricordare chi sono.
Per avermi dimostrato fin da piccola che basta davvero poco per essere felici.

A Laura,
Per il tuo carattere peperino, per i momenti in cui ci viene la debolezza, per la sincera spontaneità che metti in tutto ciò che fai.

Ad Alice,
Un uragano di anima ed energia.
Grazie perché partecipi sempre alla vita con passione, curiosità, interesse e mi mostri che, se lo si desidera, si può fare davvero ogni cosa.
Ma anche meno!

A Claudio,
Per la tua immane bontà, la vitalità con cui mi sai contagiare al solo vederti, i canti a squarciagola e i balli più soddisfacenti di tutti.
Grazie perché mi offri sempre il tuo ascolto, il tuo punto di vista pacificatore e comprensivo di tutte le parti.

A Marcella,

A te che sai emozionarti ed emozionare, vivendo la vita sentendola scorrere dentro. Grazie perché esteri la tua essenza con orgoglio e genuinità.

Tu m'hai capito.

A Nicole,

Con cui ho condiviso così tanto in questi anni di università. Di te mi ha subito conquistata la capacità di interessarti agli altri e ricordarti i dettagli che dimenticano tutti. Grazie per le risate fino a cadere per terra, per aver ripetuto con me anche quando non ce la facevo più, per avermi accompagnato nell'esperienza più importante. SOS hermanas!

A Nicolò,

Sei la prova che anche quando la vita tenta di ammazzarti, ci si può rialzare più forti di prima.

Grazie per aver incarnato il ruolo di facile bersaglio degli insulti: qualcuno lo doveva pur fare!

A tutti i miei compagni di università,

Per aver creato l'ambiente migliore che potessi desiderare, per avermi fatto sentire sempre parte di una famiglia affettuosa e accogliente, aiutandomi a coltivare la mia intelligenza e la mia imbecillità, dandomi la libertà di essere e sentirmi me stessa.

Ai professori che hanno saputo trasmettermi la loro passione, la loro cultura, il senso del dovere nei confronti della società e dell'esistenza.

Ce la metterò tutta a rendere onore al mio titolo.

Ad Antonio,

Quando ci sei è bello.

Grazie perché mi ricordi che a volte va bene essere contraddittori, se lo si è per essere felici.

Cugini, sempre.

Ad Alessandro,

Per avermi salvato la vita quando navigavo nella disperazione. A te che stimo davvero, per la tua cultura, la tua brillantezza, il tuo sarcasmo, la tua poeticità. Tu suoni corde della mia anima difficili da raggiungere.

A Riccardo,

Per cui sono cresciuta più di tutti.

Chi lo sa come e dove sarei ora, se non ci fossi stato.

Sei un essere umano così originale e trascinante, la tua viscerale energia pervade chiunque ti circonda, ma la tua bellezza è così delicata che spero tanto tu abbia scovato un modo per proteggerla. O per infrangerla, per poi ricostruirla.

Con te ho potuto emozionarmi fino alle lacrime e condividere la mia anima nuda, sentendomi meno sola nell'universo.

Senza di te ho potuto volermi bene, godendo di me stessa, bastandomi per ciò che sono, se pure continuamente in divenire.

Grazie a te ho saputo creare lo spazio nel mio cuore per accogliere una profonda felicità, e non mi accontenterò mai di meno.

A Julia,

Per la tua forza e indipendenza. Per la calma che hai sempre saputo trasmettermi, dandomi immediato conforto in ogni momento di crisi.

Grazie per avermi insegnato l'importanza del riposo e della spensieratezza, per i balli sentiti nel cuore e per i salti nel vuoto.

A George,

Cuore d'oro, anima buona. Ti doni agli altri senza mai chiedere nulla in cambio.

Grazie per i tuoi abbracci, per le storie dai dettagli esilaranti, per la tua sottile intelligenza. Sei il mio più grande esempio di coraggio e resilienza.

A Lara,

Per la tua dolcezza e la tua emotività, perché ti importano le più piccole sfaccettature dell'esistenza. Grazie perché mi ricordi che siamo pesci nel mare, che nuotano soli, sì, ma solo fino a che non si incontrano di nuovo.

A Jakub,

A te che credo di capire anche quando non capisci, con cui vorrei condividere tutti i suoni del mio cervello e le stupidaggini che combino.

Mi hai mostrato che ciascuno di noi può sorprendersi e imparare, anche quando crede di non saperlo fare.

A Bernhard,

Chico listo, per il tuo affetto e la tua molestia.

Hai saputo trasmettermi la tua voglia di lanciarti nella vita e nelle esperienze.

Grazie a te ho capito che essere diversi può essere l'ingrediente di un'amicizia esplosiva.

A Livia,

A te che cerchi di nascondere le tue debolezze, quando invece ti rendono così speciale.

Grazie per avermi accompagnato negli allenamenti più deliranti e deboli di sempre.

A tutte le persone amiche che hanno lasciato un'impronta nella mia vita.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

Direttive:

Direttiva (CE) 63/2010 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 ottobre; pag. 33-79.

Regolamenti:

Regolamento (CE) n. 1223/2009 del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 30 novembre 2009, sui prodotti cosmetici (rifusione). Gazzetta Ufficiale dell'UE, L 342/59.

Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006.

Regolamento (CE) n. 1/2005 del Consiglio, del 22 dicembre 2004, sulla protezione degli animali durante il trasporto e le operazioni correlate che modifica le direttive 64/432/CEE e 93/119/CE e il regolamento (CE) n. 1255/97.

Leggi:

Legge 12 ottobre 1993, n. 413 (Norme sull'obiezione di coscienza alla sperimentazione animale). Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n. 244, serie generale, 16 ottobre.

Decreti Legislativi:

Decreto legislativo 31 luglio 2020, n. 101. Attuazione della Direttiva 2013/59/Euratom, che stabilisce norme fondamentali di sicurezza relative alla protezione contro i pericoli derivanti dall'esposizione alle radiazioni ionizzanti, e che abroga le direttive 89/618/Euratom, 90/641/Euratom, 96/29/Euratom, 97/43/Euratom e 2003/122/Euratom e riordino della normativa di settore in attuazione dell'articolo 20, comma 1, lettera a), della legge 4 ottobre 2019, n. 117. (20G00121). Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n. 29, Supplemento ordinario alla GU n. 201 del 12 agosto - serie generale.

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. 61, serie generale, 14 marzo; pag. 2-68.

Decreto legislativo 9 aprile 2008, n. 81. Attuazione dell'articolo 1 della legge 3 agosto 2007, n. 123, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei

luoghi di lavoro. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n. 108, suppl. ordinario alla GU n. 101 del 30 aprile - serie generale.

Decreto Legislativo 12 aprile 2001, n. 206. Attuazione della Direttiva 98/81/CE che modifica la Direttiva 90/219/CE concernente l'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n. 133, supplemento ordinario alla GU n. 126 del 1.6.2001 - serie generale.

Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. Attuazione della Direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. "Linee guida Regionali per la sorveglianza ed il controllo delle acque destinate al consumo umano". Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n. 52, serie generale, 3 marzo.

Decreto Legislativo 4 dicembre 1992, n. 475. Attuazione della Direttiva 89/686/CEE in materia di ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative ai dispositivi di protezione individuale. Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana n. 128, supplemento ordinario alla GU n. 289 del 9.12.1992 - serie generale.

Decreti del Ministero della Salute:

Decreto del Ministero della Salute, 5 agosto 2021. "Disciplina sulla formazione degli addetti ai compiti e alle funzioni di cui all'articolo 23, comma 2, del decreto legislativo n. 26/2014, in materia di protezione degli animali utilizzati a fini scientifici" (21A05569). Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n. 228, serie generale, 3 settembre; pag. 46-94.

Dati statistici:

Dati statistici relativi all'utilizzo di animali a fini scientifici per l'anno 2018 (22A00590). 2022. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n. 26, serie generale, 1 febbraio; pag. 72.

Raccomandazioni:

Raccomandazione 2007/526/CE della Commissione, del 18 giugno 2007, relativa a linee guida per la sistemazione e la tutela degli animali impiegati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L 197, 30 luglio.

Linee guida:

Linee guida dell'IZSVE per la gestione di mammiferi, volatili e specie ittiche utilizzati a fini scientifici. 2019. www.izsvenezie.it.

Bibliografia e Sitografia:

- Anzidei, P., L. Frusteri, R. Giovinazzo, N. Todaro e F. Venanzetti. 2003. "Allergia al Lavoro? I principali allergeni presenti nei luoghi di lavoro" in *Consulenza tecnica accertamento rischi e prevenzione (Contarp)*, INAIL. ISBN: 88-7484-010-1.
- Bicalho, K. A., F. T. M. Araújo, R. S. Rocha e O. S. Carvalho. 2007. "Sanitary profile in mice and rat colonies in laboratory animal houses" in *Minas Gerais: I - Endo and ectoparasites*, Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v. 59, n. 6; pag. 1478-1484. DOI: 10.1590/S0102-09352007000600020.
- BIONOVA, "BT20/5 ampoule bioassays" in *www.terragene.com*.
- Buchanan-Smith, H. M., A. E. Rennie, A. Vitale, M. J. Prescott, D. B. Morton. 2005. "Harmonising the Definition of Refinement" in *Animal Welfare*, vol. 14; pag. 379-384. ISSN: 0962-7286.
- Buxbaum, L. U., P. C. DeRitis, N. Chu e P. A. Conti. 2011. "Eliminating murine norovirus by cross-fostering" in *J Am Assoc Lab Anim Sci*, vol. 50, issue 4; pag. 495-499. PMID: 21838978.
- Canadian Council on Animal Care. 2019. "CCAC guidelines: Mice." ISBN: 978-0-919087-77-4.
- Charles River. 2018. "Modules and modular facilities" in *www.criver.com*.
- Colavita, F. 2018. "Classificazione degli agenti infettivi in relazione alla sicurezza biologica", Laboratorio di Virologia e Biosicurezza, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive «L. Spallanzani» IRCCS - Roma in *www.salute.gov.it*.
- Hawkins, P., L. Playle, H. Golledge, M. Leach, R. Banzett, A. Coenen, J. Cooper, P. Danneman, P. Flecknell, R. Kirkden, L. Niel e M. Raj. 2006. "Newcastle Consensus Meeting on Carbon Dioxide Euthanasia of Laboratory Animals". University of Newcastle upon Tyne, UK.
- Hickman, D. L. 2023. "Euthanasia of Neonatal Rats and Mice using Carbon Monoxide" in *Journal of the American Association for Laboratory Animal*

Science, vol. 62, issue 5, n. 3; pag. 274-278. DOI: 10.30802/AALAS-JAALAS-22-000103.

Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies. 2011. "Guide for the care and use of laboratory animals - Eighth edition". National research council of the national academies. Washington D.C.: The National Academies Press.

Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia-Romagna (IZSLER). 2011. "Centro di Referenza Nazionale per Metodi Alternativi, Benessere e Cura degli Animali da Laboratorio" in *www.izsler.it*.

IWT S.r.l. Brochure "Washing - Cage, Rack, Tank and Bottle washers" in *www.iwtsrl.it*.

Lipman, N. S. (VM), e S. L. Leary (DVM, DACLAM). 2015. "Chapter 36 - Design and Management of Research Facilities" in *Laboratory Animal Medicine (Third Edition)*, American College of Laboratory Animal Medicine. Elsevier Inc. DOI: 10.1016/B978-0-12-409527-4.00036-5.

Mähler, M., M. Berard, R. Feinstein, A. Gallagher, B. Illgen-Wilcke, K. Pritchett-Corning e M. Raspa. 2014. "FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units" in *Sage Journal, Laboratory Animals*, vol. 48, issue 3; pag. 178–192. DOI: 10.1177/0023677213516312.

Mendoza Cavazos, C., M. Y. Heredia, L. A. Owens e L. J. Knoll. 2023. "Using *Entamoeba muris* To Model Fecal-Oral Transmission of *Entamoeba* in Mice" in *mBio*, vol. 14, n. 1. DOI: 10.1128/mbio.03008-22.

National Human Genome Research Institute (NIH). 2002. "Mouse Genome Sequenced" in *www.genome.gov*.

National Human Genome Research Institute (NIH). 2001. "International Human Genome Sequencing Consortium Publishes Sequence and Analysis of the Human Genome" in *www.genome.gov*.

Newcomer, C. E. e J. G. Fox. 2007. "Chapter 26 - Zoonoses and Other Human Health Hazards" in *The Mouse in Biomedical Research (Second Edition)*, Vol.

II. San Diego, CA: Academic Press. Pag. 719–745. DOI: 10.1016/B978-012369454-6/50054-6.

Nicklas, W., P. Baneux, R. Boot, T. Decelle, A. A. Deeny, M. Fumanelli e B. Illgen-Wilcke. 2002. “Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units - FELASA” in *Laboratory Animals Ltd*, cap. 36; pag. 20–42. DOI: 10.1258/0023677021911740.

Nicklas, W., F. R. Homberger, B. Illgen-Wilcke, K. Jacobi, V. Kraft, I. Kunstyr, M. Mähler, H. Meyer e G. Pohlmeier-Esch. 1999. “Implications of infectious agents on results of animal experiments” in *Laboratory Animals*, cap. 33 (Suppl. 1); pag. 39–87. DOI: 10.1258/002367799780639987.

Pritchett-Corning, K. R., J. B. Prins, R. Feinstein, J. Goodwin, W. Nicklas e L. Riley. 2014. “AALAS/FELASA Working Group on Health Monitoring of Rodents for Animal Transfer” in *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, vol. 53, issue 6; pag. 633-640. PMID: 25650968.

Pritchett-Corning, K. R. e C. Clifford. 2012. “Chapter 3.4 - Parasitic Infections of Laboratory Mice” in *The Laboratory Mouse*; pag. 503-518. DOI: 10.1016/B978-0-12-382008-2.00021-0.

Rodinò, P., R. Moccaldi, M. Raspa, M. C. Riviello, G. Sotis e A. Wirz. 2020. “Manuale per la gestione integrata degli stabulari” in *Quaderni de “la ricerca scientifica” n.121*, Consiglio Nazionale delle Ricerche. Roma: Cnr Edizioni.

Rubin, A. J., J. P. Engel e O. J. Sproul. 1983. “Disinfection of Amoebic Cysts in Water with Free Chlorine” in *Journal (Water Pollution Control Federation)*, vol. 55, n. 9; pag. 1174-1182 in *www.jstor.org*.

Russell, W. M. S. e R. L. Burch. 1959. “The principles of Humane Experimental Technique”. London: Methuen and Co.

Sastri, V. R. 2014. “4 - Material Requirements for Plastics Used in Medical Devices” in *Plastics in Medical Devices (Second Edition)*, William Andrew Publishing; pag. 33-54. DOI: 10.1016/B978-1-4557-3201-2.00004-5.

- Scavizzi, F., C. Bassi, L. Lupini, P. Guerriero, M. Raspa e S. Sabbioni. 2021. "A comprehensive approach for microbiota and health monitoring in mouse colonies using metagenomic shotgun sequencing" in *Animal Microbiome* 3, article n. 53. DOI: 10.1186/s42523-021-00113-4.
- Seward, J.P. 1999. "Occupational allergy to animals" in *Occupational Medicine* 14; pag. 285-304. PMID: 10329906.
- Stensvold, C. R., M. Lebbad, E. L. Victory, J. J. Verweij, E. Tannich e M. Alfellani. 2011. "Increased Sampling Reveals Novel Lineages of Entamoeba: Consequences of Genetic Diversity and Host Specificity for Taxonomy and Molecular Detection" in *Protist*, vol. 162, issue 3; pag. 525-541. DOI: 10.1016/j.protis.2010.11.002.
- Sturchio, E., E. Bemporad, G. Mari, B. Ficociello e M. Zanellato. 2010. "MOGM e sicurezza in laboratorio". Roma: INAIL Dipartimento Installazioni di Produzione e Inseguimenti Antropici Ex ISPESL.
- Swallow, J., D. Anderson, A. C. Buckwell, T. Harris, P. Hawkins, J. Kirkwood, M. Lomas, S. Meacham, A. Peters, M. Prescott, S. Owen, R. Quest, R. Sutcliffe e K. Thompson; 2005. "Guidance on the transport of laboratory animals" in *Report of the Transport Working Group, Laboratory Animal Science Association (LASA)*, vol. 39, issue 1; pag. 1-39. DOI: 10.1258/0023677052886493.
- United States Environmental Protection Agency (EPA). 2023. "Indoor Air Quality (IAQ)" in *www.epa.gov*.
- Yue, F., Y. Cheng, A. Breschi, J. Vierstra, W. Wu, T. Ryba, R. Sandstrom, Z. Ma, C. Davis, B. D. Pope, Y. Shen, D. D. Pervouchine, S. Djebali, R. E. Thurman, R. Kaul, E. Rynes, A. Kirilusha, G. K. Marinov, B. A. Williams, D. Trout, H. Amrhein, K. Fisher-Aylor, I. Antoshechkin, G. DeSalvo, L. H. See, M. Fastuca, J. Drenkow, C. Zaleski, A. Dobin, P. Prieto, J. Lagarde, G. Bussotti, A. Tanzer, O. Denas, K. Li, M. A. Bender, M. Zhang, R. Byron, M. T. Groudine, D. McCleary, L. Pham, Z. Ye, S. Kuan, L. Edsall, Y. C. Wu, M. D. Rasmussen, M. S. Bansal, M. Kellis, C. A. Keller, C. S. Morrissey, T. Mishra, D. Jain, N. Dogan, R. S. Harris, P. Cayting, T. Kawli, A. P. Boyle, G. Euskirchen, A. Kundaje, S. Lin, Y. Lin, C. Jansen, V. S. Malladi, M. S.

Cline, D. T. Erickson, V. M. Kirkup, K. Learned, C. A. Sloan, K. R. Rosenbloom, B. Lacerda de Sousa, K. Beal, M. Pignatelli, P. Flicek, J. Lian, T. Kahveci, D. Lee, W. J. Kent, M. Ramalho Santos, J. Herrero, C. Notredame, A. Johnson, S. Vong, K. Lee, D. Bates, F. Neri, M. Diegel, T. Canfield, P. J. Sabo, M. S. Wilken, T. A. Reh, E. Giste, A. Shafer, T. Kutuyavin, E. Haugen, D. Dunn, A. P. Reynolds, S. Neph, R. Humbert, R. S. Hansen, M. De Bruijn, L. Selleri, A. Rudensky, S. Josefowicz, R. Samstein, E. E. Eichler, S. H. Orkin, D. Levasseur, T. Papayannopoulou, K. H. Chang, A. Skoultschi, S. Gosh, C. Disteché, P. Treuting, Y. Wang, M. J. Weiss, G. A. Blobel, X. Cao, S. Zhong, T. Wang, P. J. Good, R. F. Lowdon, L. B. Adams, X. Q. Zhou, M. J. Pazin, E. A. Feingold, B. Wold, J. Taylor, A. Mortazavi, S. M. Weissman, J. A. Stamatoyannopoulos, M. P. Snyder, R. Guigo, T. R. Gingeras, D. M. Gilbert, R. C. Hardison, M. A. Beer e B. Ren; Mouse ENCODE Consortium. 2014. "A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome" in *Nature* 515, pag. 355-364. DOI: 10.1038/nature13992.

Zanetti, A. S., A. F. Malheiros, T. A. de Matos, C. dos Santos, P. F. Battaglini, L. M. Moreira, L. M. S. Lemos, S. K. I. Castrillon, D. C. B. Cortela, E. Ignotti e O. A. Espinosa. 2021. "Diversity, geographical distribution, and prevalence of *Entamoeba* spp. in Brazil: a systematic review and meta-analysis" in *Parasite*, vol. 28, article 17. EDP Sciences. DOI: 10.1051/parasite/2021028.