

Consiglio Nazionale delle Ricerche

QUADERNI

DE

“LA RICERCA SCIENTIFICA”

**MANUALE PER LA
GESTIONE INTEGRATA
DEGLI STABULARI**

Principi e indicazioni
per la protezione degli animali
e la sicurezza dei lavoratori

A cura di

Paola Rodinò, Roberto Moccaldi,
Marcello Raspa, Maria Cristina Riviello,
Gianluca Sotis, Annarita Wirz

– 121 –

ROMA - 2020

QUADERNI DE “LA RICERCA SCIENTIFICA”

– **121** –

Consiglio Nazionale delle Ricerche

QUADERNI

DE

“LA RICERCA SCIENTIFICA”

MANUALE PER LA GESTIONE INTEGRATA DEGLI STABULARI

Principi e indicazioni
per la protezione degli animali
e la sicurezza dei lavoratori

A cura di

Paola Rodino', Roberto Moccaldi,
Marcello Raspa, Maria Cristina Riviello,
Gianluca Sotis, Annarita Wirz

– 121 –

ROMA - 2020

Copyright © 2020



Piazzale Aldo Moro 7, Roma

bookshop@cnr.it

www.edizioni.cnr.it

Edizione aggiornata

Presentazione alla seconda edizione

La seconda edizione del “Manuale per la gestione integrata degli stabulari” - principi e indicazioni per la protezione degli animali e la sicurezza dei lavoratori – è divenuta necessaria in seguito alla emanazione della Direttiva 2010/63/UE, revisione della Direttiva 86/609, recepita in Italia con il Decreto Legislativo 26/2014 il 4 marzo 2014.

Tale Direttiva è il risultato di un lungo *iter* di revisione che ha visto tutti gli Stati membri collaborare nella direzione di armonizzare l'utilizzo dell'animale da laboratorio nella ricerca scientifica con l'intento prioritario di garantire la salvaguardia del benessere animale.

Le molteplici modifiche normative introdotte nel D.lgs. 26/2014 hanno comportato la totale riscrittura della Prima parte del Manuale e una riscrittura parziale della Seconda parte; tutti gli altri capitoli sono stati comunque aggiornati, compresa la bibliografia e i riferimenti normativi.

La grande novità editoriale riguarda la pubblicazione del testo non più in forma cartacea ma in formato digitale. Il “Manuale per la gestione integrata degli stabulari” - principi e indicazioni per la protezione degli animali e la sicurezza dei lavoratori – sarà, in questa seconda edizione, **un e-book, scaricabile gratuitamente.**

Mi auguro, quindi, che tale modalità di accesso al Manuale possa ampliare di molto la sua diffusione e consultazione, contribuendo a fornire agli addetti ai lavori un valido aiuto nel migliorare la qualità delle condizioni di lavoro, la protezione e il benessere degli animali.

Roma, giugno 2020

Dott. Gianluca Sotis
Responsabile dell'Unità di
Prevenzione e Protezione
del CNR

BetMultimedia

Editing, grafica e stampa
www.betmultimedia.it
info@betmultimedia.it

2020

Gruppo di lavoro sulle attività e i rischi lavorativi nella ricerca scientifica con modelli animali

Paola Rodinò (Coordinatore) - Unità di Prevenzione e Protezione - CNR

Roberto Moccaldi - Unità di Prevenzione e Protezione - CNR

Marcello Raspa - Istituto di Biochimica e Biologia Cellulare - CNR

Maria Cristina Riviello - Istituto di Biochimica e Biologia Cellulare - CNR

Gianluca Sotis - Unità di Prevenzione e Protezione - CNR

Annarita Wirz - Fondazione Santa Lucia - Roma

Indice

	Pag
Introduzione	11

Parte prima

Legislazione e Sperimentazione

1	Normativa sulla sperimentazione animale.....	17
	1.1 Stabilimenti	19
	1.2 Figure professionali.....	20
	1.3 Utilizzo a fini scientifici degli animali da laboratorio.....	24
	1.4 Registri carico/scarico animali.....	25
	1.5 Formazione.....	26

Parte seconda

Progettazione e Organizzazione della Struttura e Aspetti Sanitari

2	Progettazione e organizzazione dello stabulario.....	29
	2.1 Aree deputate alla stabulazione degli animali.....	32
	2.2 Aree deputate al lavaggio delle attrezzature e al ricevimento e stoccaggio dei materiali	35
	2.3 Classificazione degli animali in base alle loro caratteristiche microbiologiche.....	36
3	Regole di stabulazione.....	39
	3.1 Parametri ambientali delle stanze di stabulazione	39
	3.2 Attrezzature e materiali.....	41
	3.3 Procedure di pulizia, sanitizzazione e sterilizzazione.....	46
	3.4 Controllo degli infestanti.....	49
4	Controlli sanitari e monitoraggi ambientali in stabulario	50
	4.1 Programma di controllo sanitario.....	51
	4.2 Monitoraggio ambientale	54

4.3	Controllo del personale.....	56
4.4	Interventi in caso di contaminazione da patogeni (<i>Facility Outbreak</i>).....	56
5	Anestesia, analgesia e eutanasia	59
5.1	Anestesia generale	60
5.2	Anestesia locale	62
5.3	Eutanasia	65
6	Importazioni, scambi e trasporto di animali	66

Parte terza

Individuazione e Prevenzione dei Rischi

7	Prevenzione nei luoghi di lavoro: cenni normativi e concetti generali	73
8	Impianti e gestione delle emergenze	77
9	Rischi da agenti chimici	82
10	Rischi da agenti fisici e da sovraccarico dell'apparato muscolo-scheletrico ..	86
11	Rischi da agenti biologici	90
11.1	Rischi da potenziale esposizione ad agenti biologici legati alla manipolazione e al trattamento degli animali.....	94
11.2	Rischi da uso deliberato di agenti biologici negli animali da esperimento	95
11.3	Microrganismi geneticamente modificati.....	99
11.4	Zoonosi.....	102
12	Allergie	105
13	Rischi da radiazioni ionizzanti	111
14	Dispositivi di Protezione Individuale	115
15	Sorveglianza sanitaria	120

Parte quarta

Aspetti Speciali

16	Organismi animali geneticamente modificati come modelli di malattia	125
17	I metodi alternativi alla sperimentazione in vivo	131
	Bibliografia e Riferimenti normativi	139

Introduzione

Le attività di sperimentazione animale e di stabulazione sono di primario interesse per molti Istituti del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Università e altri centri di ricerca pubblici e privati.

L'organizzazione e la gestione di una struttura complessa come lo stabulario devono essere condotte nel rispetto di standard internazionali codificati attraverso norme e regolamenti e devono garantire, attraverso un approccio collaborativo multidisciplinare in fase di progettazione e di gestione, sia il benessere degli animali sia le condizioni di sicurezza degli sperimentatori e degli operatori. Per rispondere compiutamente a tale impostazione è stato costituito, all'interno dell'Ufficio Prevenzione e Protezione del CNR, un gruppo di lavoro multidisciplinare in cui le competenze di sicurezza e prevenzione dei rischi negli ambienti di lavoro, sono integrate da quelle tecniche e di gestione, derivanti da esperienze professionali presso alcuni importanti stabulari dell'Ente. Il gruppo si propone, tra l'altro, di fornire linee di indirizzo operativo e supporto all'elaborazione di materiale utile alla formazione e all'addestramento degli operatori nella convinzione che questi rappresentano momenti centrali per l'adozione di buone prassi nella sperimentazione e per la prevenzione nei luoghi di lavoro.

In questo manuale si affrontano specificamente le tematiche proprie degli stabulari che ospitano specie quali topi e ratti e che rappresentano la quasi totalità delle strutture di stabulazione dedicate alla sperimentazione. Gli ultimi dati pubblicati in Italia dal Ministero della Salute (riferiti al 2017) riportano, infatti, che l'85% degli animali utilizzati nella sperimentazione animale nel nostro Paese sono roditori, di questi 357.645 sono topi (*Mus musculus*) e 117.766 ratti (*Rattus norvegicus*).

La visione integrata delle problematiche inerenti la sperimentazione animale che caratterizza il testo, assume come elemento fondante la necessità imprescindibile di coniugare la qualità della ricerca con un uso e una cura degli animali da esperimento improntati a principi etici, in accordo anche con l'aumentata attenzione e sensibilità per tali problemi registrate nel corso degli ultimi anni, da parte della comunità scientifica e dall'opinione pubblica. Queste tendenze sono alla base dell'emanazione di apposite normative sia a livello nazionale che europeo sulla sperimentazione animale che, a loro volta, ne hanno favorito il consolidamento. La Direttiva Europea 86/609, recepita in Italia con il Decreto Legislativo 116/92 ha, infatti, introdotto concetti importanti come quello dell'ottimizzazione della qualità e dello stato sanitario degli animali e quello della standardizzazione delle condizioni ambientali e di mantenimento necessari ad assicurare il benessere degli animali da laboratorio. Maggiore attenzione al benessere degli animali viene posta, poi, nella Direttiva 2010/63/UE, revisione della Direttiva 86/609, recepita in Italia con il Decreto Legislativo 26/2014 il 4 marzo 2014.

L'attenzione crescente da parte dell'opinione pubblica nei confronti del benessere animale ha portato la Commissione Europea a inserire in tale Direttiva la costituzione, presso ogni struttura che alleva, fornisce e utilizza animali per la ricerca, di un "organismo preposto al benessere degli animali" (*animal-welfare body*). Esso ha il compito di consigliare il personale che si occupa degli animali su questioni concernenti il loro benessere, di tenerlo informato sugli sviluppi tecnici e scientifici in materia di applicazione di tale principio, di seguire lo sviluppo e l'esito dei progetti tenendo conto degli effetti sugli animali utilizzati, di fornire consulenza in merito ai programmi di reinserimento, di promuovere l'applicazione dei principi delle 3R (*Replacement, Reduction e Refinement*), Art. 25 e 26 del D.Lgs 26/2014.

Tra le novità importanti presenti nel D.Lgs 26/2014 vi è che tutti i progetti dovranno essere presentati alle autorità competenti solo come richiesta di autorizzazione, la quale dovrà essere sempre acquisita. La concessione dell'autorizzazione dei progetti di ricerca da parte delle autorità competenti verrà, inoltre, anche subordinata ai risultati di "un'analisi dei danni e dei benefici del progetto, per comprendere se il danno arrecato agli animali in termini di sofferenza, dolore o angoscia sia giustificato dal risultato atteso, tenuto conto di considerazioni etiche, e possa, in definitiva, andare a beneficio degli esseri umani, degli animali e dell'ambiente".

Il Decreto prevede all'Art. 38, inoltre, la creazione di un Comitato Nazionale per la protezione degli animali usati a fini scientifici, che ha sia il compito di fornire consulenza alle autorità competenti e agli organismi preposti al benessere degli animali sia quello di favorire lo scambio d'informazioni su tali argomenti e la condivisione delle *best practices* con analoghi comitati di altri Paesi dell'Unione Europea.

In questo manuale tutti gli argomenti sono stati affrontati in maniera semplice e discorsiva con l'intento di redigere un testo conciso e facilmente consultabile che descriva i principi e le prassi per una corretta gestione degli stabulari secondo un approccio integrato che consideri contestualmente sia gli aspetti riguardanti la sperimentazione animale sia quelli di sicurezza e salute degli operatori e dei ricercatori.

Il testo fornisce informazioni e indicazioni a tutte le figure che, a vario livello, assumono ruoli e responsabilità in queste strutture (datori di lavoro, responsabili del benessere animale, progettisti, stabularisti, ricercatori, personale in formazione, responsabili e addetti al servizio di prevenzione e protezione, medici competenti), in merito sia alla progettazione, all'organizzazione e alla gestione sia ai pericoli e ai rischi presenti nell'ambiente di lavoro e alle misure di prevenzione e protezione che si possono adottare.

Gli autori hanno scelto una presentazione grafica che prevede la divisione della pagina in due colonne: nella colonna di sinistra sono presenti le informazioni teoriche, con gli opportuni riferimenti legislativi; nella colonna di destra sono presenti, invece, alcune indicazioni operative e i consigli pratici che sono il risultato di anni di esperienza maturata "sul campo" dagli autori.

Il testo risulta diviso in quattro parti: la prima parte tratta degli aspetti legislativi; la seconda si occupa della progettazione, organizzazione e gestione degli stabulari; la terza dell'individuazione

e prevenzione dei rischi per gli operatori; la quarta, infine, esamina alcuni aspetti emergenti nel campo della sperimentazione animale, ovvero le tematiche relative agli animali geneticamente modificati utilizzati in ricerca e ai metodi alternativi alla sperimentazione animale.

Nello specifico, **la prima parte** si occupa della normativa attualmente vigente in Italia, che regola l'utilizzo dell'animale da laboratorio.

Attraverso questo *corpus* normativo sono stati via via regolamentati aspetti critici come il benessere degli animali, il controllo di tutte le figure che, per vari motivi, rientrano almeno in una delle fasi di utilizzazione dell'animale e le procedure di autorizzazione da parte dell'autorità competente.

La seconda parte fornisce indicazioni sulla progettazione, organizzazione e gestione degli stabulari. Per realizzare un buon progetto è necessario un approccio basato sull'integrazione di competenze e professionalità (architetto, ingegnere, veterinario, responsabile del benessere animale, ricercatore, stabularista, responsabile del servizio di prevenzione e protezione, medico competente) in modo da mettere a frutto le rispettive esperienze, modulando le soluzioni in funzione degli obblighi normativi e delle specifiche esigenze della ricerca. Uno stabulario ben progettato, ben costruito e con una buona e costante manutenzione garantisce, infatti, sia una corretta stabulazione degli animali sia le condizioni di sicurezza del lavoro per gli operatori.

In questa parte sono analizzate anche le problematiche relative agli stabulari convenzionali, che rappresentano il tipo di struttura più diffusa sul territorio nazionale, e agli stabulari barrierati, strutture che ospitano animali appartenenti alle categorie *Germ Free* e *Specific Pathogen Free*. Oltre alle regole di stabulazione (parametri ambientali, alimentazione e idratazione, arricchimento ambientale, pulizia, controllo degli infestanti), vengono presi in considerazione i controlli sanitari degli animali, i monitoraggi ambientali in stabulario, le pratiche di anestesia, analgesia ed eutanasia e le norme che regolano il trasporto, l'importazione e gli scambi degli animali.

La terza parte si occupa dell'individuazione e prevenzione dei rischi per la sicurezza e la salute degli operatori. Le principali norme di riferimento in materia sono costituite dal D.Lgs 81/08 e, per quanto riguarda i rischi da radiazioni ionizzanti, dal D.Lgs 230/95.

Sono descritti ed esaminati i principali rischi che possono essere presenti all'interno degli stabulari, inerenti sia la stabulazione diretta degli animali, sia il loro trattamento ai fini di ricerca. Infine, vengono presi in considerazione i rischi dovuti all'utilizzo di macchine, attrezzature e impianti propri dello stabulario, dando nel contempo indicazioni sulle misure di prevenzione e protezione da adottare, con un'attenzione particolare ai dispositivi di protezione individuale e alla sorveglianza sanitaria degli esposti.

La quarta parte esamina due aspetti di particolare rilievo nel campo della sperimentazione animale, ovvero la produzione e l'utilizzo degli animali geneticamente modificati ed i metodi alternativi alla sperimentazione *in vivo*.

Gli Autori

Parte prima

Legislazione e Sperimentazione

Parte prima

Legislazione e Sperimentazione

1 Normativa sulla sperimentazione animale

In Italia l'utilizzo dell'animale da laboratorio è regolamentato dal D.Lgs 26/2014 entrato in vigore il 29 marzo 2014, recependo così la Direttiva 2010/63/UE del 22 settembre 2010.

La Direttiva 2010/63/UE è il risultato di un *iter* di revisione durato molti anni che ha visto tutti gli Stati membri collaborare nella direzione di armonizzare l'utilizzo dell'animale da laboratorio nella ricerca scientifica con l'intento prioritario di garantire la salvaguardia del benessere animale.

In Italia, la storia normativa riguardante la sperimentazione scientifica con l'uso di animali risale alla Legge n. 615 del 1941. Questa legge conferiva ai Direttori degli Istituti e dei Laboratori scientifici la diretta responsabilità degli esperimenti in cui venivano utilizzati animali da laboratorio. Ciò significava la totale libertà di autorizzare esperimenti su qualunque specie animale. Unico vincolo riguardava il titolo di studio che doveva possedere chi era autorizzato a compiere gli esperimenti. Infatti, i titoli di studio previsti erano solamente: laurea in Medicina e Chirurgia, Medicina Veterinaria, Scienze Biologiche e Scienze Naturali.

Soltanto nel 1992 è entrato in vigore il D.L. 116/92 che ha, quindi, riempito un vuoto legislativo durato decenni, introducendo concetti importanti come il benessere animale e l'autocontrollo di tutte le figure che, per vari motivi, rientravano almeno in una delle fasi di utilizzazione degli animali. In questo modo si evidenziava un avanzamento scientifico e morale in quanto, se da una parte si riconosceva l'innegabile necessità di questo tipo di sperimentazione, dall'altra si tutelava e si regolamentava l'uso dell'animale da laboratorio. Il D.L. 116/92 e le successive circolari applicative (n. 8 del 1994, n. 6 del 14 maggio del 2001) impartivano direttive in relazione all'utilizzo degli animali vertebrati a scopo sperimentale e didattico. Lo scopo principale era

Indicazioni operative

quello di proteggere gli animali usati nelle procedure sperimentali e garantire loro il massimo benessere, limitando il più possibile il dolore, la sofferenza, l'angoscia, i danni temporanei e durevoli che possono prodursi sugli animali nel corso di alcune sperimentazioni. Inoltre, si proponeva anche di ridurre quanto più possibile il numero degli esperimenti e il numero degli animali usati.

Oggi, con l'entrata in vigore del D.Lgs 26/2014, il benessere animale viene messo al centro dell'interesse del legislatore e del ricercatore. Questo decreto, infatti, con i suoi cambiamenti rispetto al D.L. 116/92, esalta ancora di più l'attenzione verso l'animale. Sono molti gli aspetti presenti nella nuova legge che evidenziano ciò, dalle indicazioni obbligatorie delle dimensioni e della complessità dello spazio che gli animali devono avere a disposizione, fino all'obbligo della formazione per il personale che, a vario titolo, lavora con gli animali. Inoltre, la nuova legge, oltre ai vertebrati, inserisce per la prima volta una classe di invertebrati, quella dei cefalopodi. Questi invertebrati, infatti, hanno un sistema nervoso particolarmente complesso ed un repertorio comportamentale molto ricco.

Oggi questa legge deve rappresentare il punto di riferimento legislativo per chiunque intenda effettuare attività di ricerca con l'utilizzo di animali.

Il Ministero della Salute è l'autorità competente di riferimento. A tale organo competono l'accertamento e la vigilanza sulla corretta applicazione della normativa, il rilascio delle previste autorizzazioni, il controllo dei registri di carico e scarico degli animali, la raccolta dei dati statistici sull'utilizzazione degli animali e la relativa pubblicazione annuale sulla Gazzetta Ufficiale.

Si fa, inoltre, presente che 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.

“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” (art. 1).

“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” (art. 3, comma 5).

Per una più esaustiva informazione sulle modalità di stabulazione degli animali si possono consultare oltre agli Allegati del D.Lgs 26/2014 anche le Raccomandazioni 2007/526/CE

11 Stabilimenti (Stabulari)

Lo stabilimento nell' art. 3, comma c del D.Lgs 26/2014 viene definito come:

“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”.

Per gli stabilimenti allevatori o fornitori degli animali destinati alla ricerca scientifica il Comune è l'autorità competente per il rilascio dell'autorizzazione, la sospensione o la revoca dell'esercizio (Art. 4, D.Lgs 26/2014).

Per gli stabilimenti utilizzatori, in cui gli animali vengono stabulati per essere utilizzati nella sperimentazione scientifica, il Ministero della Salute è l'autorità competente per il rilascio dell'autorizzazione, previa visita ispettiva, per la sospensione o la revoca dell'esercizio (Art. 4, 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).

COMPITI DELLE AUTORITA' COMPETENTI (AC):

Ministero della Salute:

- rilascia l'autorizzazione per l'apertura di stabilimenti utilizzatori, previa sua visita ispettiva e previo rilascio del nulla osta igienico-sanitario;
- effettua attività ispettiva negli stabilimenti utilizzatori;
- rilascia le autorizzazioni dei progetti di ricerca.

ASL:

- effettua visite ispettive negli stabilimenti di allevamento e di fornitura;
- effettua visite di vigilanza negli stabilimenti utilizzatori;
- rilascia parere igienico-sanitario.

Le AC effettuano ispezioni regolari sugli allevatori, sui fornitori e sugli utilizzatori ed i rispettivi stabilimenti, nonché sull'esecuzione dei progetti per verificare la conformità degli stessi con i requisiti del presente decreto e dell'autorizzazione rilasciata. Una percentuale appropriata di ispezioni è effettuata senza preavviso.

COMUNE:

- rilascia l'autorizzazione per l'apertura di stabilimenti di allevamento e di fornitura.

REGIONE:

- eroga le sanzioni ai sensi dell'Art. 40 del D.Lgs 26/2014.



Figura 1. Stanza di stabulazione

1.2 Figure professionali

Le figure professionali che devono sottoscrivere un protocollo sperimentale (Allegato VI) sono:

- Responsabile del Benessere Animale;
- Veterinario Designato;
- Responsabile del Progetto di Ricerca.

Responsabile del Benessere Animale

In tutti gli stabulari deve essere individuato un Responsabile che si occupi sia del benessere animale e della loro assistenza, sia del funzionamento delle attrezzature. Questa figura deve avere un'adeguata competenza tecnico-scientifica. Al Responsabile competono tutti gli aspetti inerenti la gestione e l'organizzazione dello stabulario, quali:

- indicare le corrette condizioni sociali, ambientali e sanitarie per un'adeguata stabulazione degli animali ospitati nella struttura, al fine di garantirne il loro benessere psico-fisico;
- vigilare sulla corretta applicazione delle vigenti norme connesse alla stabulazione e alla sperimentazione animale all'interno della struttura;
- vigilare sull'operato del personale a cui sono affidate le operazioni di pulizia e stabulazione degli animali;
- curare la corretta compilazione dei registri di carico e scarico degli animali;
- organizzare un corretto smaltimento di tutte le tipologie di rifiuti connessi con le attività previste nella struttura;
- controllare la corretta compilazione e trasmissione del progetto di ricerca, ai sensi del D.Lgs 26/2014;
- vigilare sul corretto svolgimento delle funzioni e dei compiti attribuiti al Veterinario Designato;
- comunicare al Ministero della Salute, tramite la piattaforma telematica (<https://stabulari.izs.it>), i dati statistici sull'utilizzazione di animali a fini sperimentali, come previsto dalla Decisione di esecuzione della Commissione 2012/707/UE;
- provvedere affinché siano rispettate e salvaguardate le condizioni igieniche e la salute del personale che attende alla conduzione dello stabulario e che svolge la sperimentazione animale nello stabilimento da lui diretto;
- redigere le Procedure Operative Standard (SOP) per le varie attività di pulizia, sanitizzazione e stabulazione e di cura degli animali;
- promuovere e curare l'aggiornamento e la formazione del personale che opera nella struttura.

Visti i molteplici aspetti che un Responsabile del Benessere Animale è chiamato a seguire è raccomandabile identificare una persona che si dedichi esclusivamente a questa funzione.

Veterinario Designato (Art. 24 del D.Lgs 26/2014)

Al Veterinario Designato compete il controllo delle condizioni di salute e del benessere degli animali oltre all'assistenza sanitaria nelle diverse fasi sperimentali. Il Veterinario può essere un dipendente della struttura oppure un libero professionista. Inoltre, deve essere in possesso di requisiti di esperienza e di formazione specifici inerenti gli animali da laboratorio.

Il Veterinario deve in particolare:

- controllare il benessere e le condizioni di salute degli animali allo scopo di evitare danni durevoli, inutili sofferenze e angoscia;
- fornire al Responsabile del Benessere Animale la propria assistenza veterinaria, nonché la propria consulenza per garantire il benessere degli animali. A tale scopo esegue regolari ispezioni periodiche verificando le condizioni in cui sono alloggiati e curati gli animali. Il Veterinario segnalerà al Responsabile del Benessere Animale eventuali inconvenienti riscontrati;
- controllare la buona esecuzione delle procedure di esperimento, al termine delle quali dovrà decidere se l'animale potrà essere mantenuto in vita o soppresso. Quest'ultima decisione ricorre comunque quando, terminata la procedura sperimentale, permangono dolore e sofferenza;
- decidere, al termine della procedura sperimentale, l'eventuale applicazione dell'istituto dell'affidamento in adozione nei casi in cui le condizioni di salute degli animali lo consentano e quando pervengano richieste da parte di associazioni animaliste, di privati o Comuni;
- provvedere, unitamente al Responsabile del Progetto di Ricerca, alla verifica generale del protocollo sperimentale, sottoscrivendolo per quanto di competenza.

Durante le procedure sperimentali, non implicanti tecniche a rischio per il benessere animale e la cui esecuzione è realizzata secondo prassi di laboratorio consolidate, non è necessaria la presenza costante del Veterinario. Tale valutazione di rischio è, comunque, a discrezione del Veterinario stesso.

Responsabile del Progetto di Ricerca

Il D.Lgs 26/2014 individua come Responsabile del Progetto di Ricerca colui che è responsabile degli aspetti scientifici e amministrativi del progetto ed è la persona a cui è intestata l'autorizzazione del progetto. Deve essere persona qualificata e con comprovata esperienza.

Al Responsabile del Progetto di Ricerca compete in particolare:

- l'elaborazione della documentazione relativa alla presentazione dei progetti di ricerca al Ministero della Salute. Il progetto di ricerca dovrà essere sottoscritto, per quanto di competenza, anche dal Veterinario Designato e dal Responsabile del Benessere Animale;
- la nomina del Responsabile dell'Esecuzione degli Esperimenti, qualora gli esperimenti non li eseguisse

La stesura del progetto di ricerca deve avvenire in stretto coordinamento con il Responsabile del Benessere Animale e con il Veterinario Designato

personalmente. Il Responsabile dell'Esecuzione degli Esperimenti deve avere un'adeguata e comprovata formazione nell'utilizzo del modello animale.

Sia il responsabile del Progetto di Ricerca, sia il Responsabile dell'Esecuzione degli Esperimenti devono assicurarsi che il personale coinvolto nelle procedure sperimentali abbia un'adeguata formazione al riguardo.

Organismo Preposto al Benessere degli Animali (Artt. 25 e 26 D.Lgs 26/2014)

Il D.Lgs 26/2014 obbliga tutti gli stabilimenti ad avere un Organismo Preposto al Benessere degli Animali (OPBA). Questa struttura deve essere costituita da almeno 3 figure professionali, quali il Responsabile del Benessere Animale, il Veterinario Designato e un Membro Scientifico. A queste figure se ne possono aggiungere altre, a discrezione della struttura, come ad esempio quella del Biostatistico.

L'OPBA ha diversi compiti tra i quali:

- consulenza sul benessere degli animali, la loro cura ed impiego, gestione e stabulazione; sul rispetto ed applicazione del principio delle 3R (vedi cap. 17); su eventuali programmi di riutilizzo e/o reinserimento degli animali da laboratorio;
- promozione della formazione del personale che utilizza gli animali da laboratorio;
- rilascio del parere motivato sui progetti di ricerca da presentare al Ministero della Salute, andando a valutare in particolare la conformità del progetto rispetto a quanto richiesto dalla normativa; la rilevanza tecnico-scientifica; il danno-beneficio. Deve inoltre rilasciare un parere motivato anche su eventuali integrazioni di protocolli già approvati e delle valutazioni retrospettive;
- sottomissione delle domande di autorizzazione dei progetti di ricerca ed eventuali integrazioni, notifiche e valutazioni retrospettive, tramite sistema telematico.

In molte istituzioni l'OPBA ha sostituito il Comitato Etico.

Come previsto dalla normativa, i piccoli allevatori, fornitori ed utilizzatori possono affidarsi ad un OPBA esterno, che opera in un'altra struttura.

13 Utilizzo a fini scientifici degli animali da laboratorio

L'attuale normativa consente l'utilizzo degli animali a fini scientifici o educativi soltanto quando, per ottenere il risultato ricercato, non sia possibile utilizzare altro metodo scientificamente riconosciuto e validato.

Il D.Lgs 26/2014 si applica agli animali vertebrati vivi, comprese le forme larvali autonome, e forme fetali di mammiferi a partire dall'ultimo terzo del periodo di gestazione.

Per la prima volta rientra, tra gli animali protetti dal Decreto, una classe di Invertebrati, quella dei Cefalopodi.

Non rientrano in questa definizione le pratiche agricole, quali la marcatura, il contenimento e le attività espletate per il governo degli animali, per le pratiche cliniche veterinarie e per i metodi meno dolorosi di uccisione, quali quelli applicati per la macellazione, l'abbattimento e la soppressione umanitaria degli animali.

Gli esperimenti devono essere eseguiti solo su animali appartenenti alle specie considerate nel D.Lgs 26/2014 e provenienti da stabilimenti di allevamento autorizzati.

Tutti gli esperimenti devono avvenire in anestesia o analgesia, allo scopo di salvaguardare il benessere degli animali, a meno che l'anestesia non sia più traumatica per l'animale rispetto alla procedura sperimentale oppure se risulta essere incompatibile con le finalità di alcune procedure, ad esempio quelle che riguardano le osservazioni del comportamento.

La legge richiede, inoltre, che vengano preferiti tutti quegli esperimenti per i quali è possibile:

- utilizzare il minor numero di animali;
- utilizzare specie con il più basso sviluppo neurologico;
- ridurre il dolore, la sofferenza e i danni durevoli;
- ottenere, con maggior probabilità, risultati scientifici soddisfacenti.

Inoltre, la legge richiede che sia dimostrata l'impossibilità a ricorre ad altri metodi scientificamente validi alternativi all'uso degli animali. Chiunque intenda effettuare esperimenti su animali deve informare il Ministero della Salute, sottomettendo tramite invio telematico un

apposito schema per la presentazione di un progetto di ricerca (vedi All. VI del D.Lgs 26/2014).

Presentazione dei progetti di ricerca

Un progetto di ricerca deve essere sottomesso tramite invio telematico (<https://stabulari.izs.it>) al Ministero della Salute, e può avere inizio solo dopo il rilascio dell'autorizzazione da parte dello stesso. Tale autorizzazione viene concessa dal Ministero dopo aver ottenuto anche il parere favorevole dell'Istituto Superiore di Sanità oppure del Consiglio Superiore di Sanità solo nel caso di utilizzo di primati non umani, cani, gatti o specie in via di estinzione. Tutti gli esperimenti devono essere eseguiti conformemente al protocollo inviato al Ministero e qualunque variazione deve essere comunicata tramite richiesta di integrazione. Il protocollo sperimentale può avere una durata massima di 5 anni.

14 Registri carico/scarico animali

Tutti gli animali utilizzati o allevati per scopi scientifici devono essere riportati o su appositi registri cartacei oppure sulla piattaforma telematica del Ministero della Salute sul Sistema Informativo Sperimentazione Animale (<https://stabulari.izs.it>).

I registri cartacei devono essere preventivamente vidimati dal Ministero della Salute (o dal Comune nel caso di stabulari di allevamento e fornitori) e conservati per almeno 3 anni a disposizione degli organi di controllo.

Entro il 31 marzo di ogni anno, i Responsabili del Benessere Animale degli stabilimenti utilizzatori devono inviare al Ministero della Salute, i dati relativi all'impiego degli animali utilizzati a fini sperimentali nell'anno precedente. Ciò deve avvenire tramite l'inserimento dei dati sulla piattaforma telematica del Ministero della Salute sul Sistema Informativo Sperimentazione Animale.

Questi dati costituiranno base essenziale delle informazioni che debbono essere trasmesse alla Commissione della Comunità Europea e verranno pubblicati nella Gazzetta Ufficiale.

Ogni tipologia di stabulario deve avere il proprio registro. Pertanto, se lo stabulario di un centro ha due autorizzazioni (es allevamento ed utilizzatore), deve avere due registri.

15 Formazione

La competenza, la professionalità e un'adeguata formazione sono requisiti essenziali per tutti coloro che, seppur con diversi compiti e funzioni, sono coinvolti nella sperimentazione animale. Solo ciò può garantire un uso eticamente e scientificamente corretto degli animali impiegati nella ricerca. La normativa italiana richiede che le persone che svolgono o prendono parte a esperimenti, così come le persone che si occupano della cura e del mantenimento di animali utilizzati a tale fine, abbiano una formazione ed una preparazione adeguata. A tal proposito, il D.Lgs 26/2014 all'Art. 23 comma 2 elenca le funzioni per cui si deve prevedere obbligatoriamente la formazione del personale che dovrà assolvere a una o più delle funzioni elencate.

Per comprendere meglio la tipologia dei temi da considerare nella formazione si può far riferimento a quanto suggerito dalla *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) che da parecchi anni ha avviato un processo di definizione e classificazione dei vari profili professionali e della loro formazione (www.felasa.eu), e al documento elaborato dal gruppo di lavoro europeo "A working document on the development of a common education and training frame work to fulfil the requirements under the Directive" - Brussels, 19-20 February 2014 (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/Endorsed_E-T.pdf).

Parte seconda

**Progettazione e Organizzazione
della Struttura e Aspetti Sanitari**

Parte seconda

Progettazione e Organizzazione della Struttura e Aspetti Sanitari

2 Progettazione e organizzazione dello stabulario

Uno stabulario ben progettato, ben costruito e con una buona e costante manutenzione, garantisce sia una corretta stabulazione degli animali, sia le condizioni di sicurezza nel lavoro per gli operatori.

Questa struttura, per sua natura, è destinata a funzionare senza interruzione 24 ore al giorno, inclusi i festivi. Di conseguenza sono necessari assidui controlli tecnici agli impianti e soluzioni programmate di emergenza in caso di guasti e malfunzionamenti.

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. Nel progettare uno stabulario è, comunque, importante tenere presente eventuali ampliamenti degli spazi e delle attività che si potrebbero verificare nel tempo. Inoltre, essendo la ricerca un'attività con ampi margini d'imprevedibilità e in rapida e progressiva evoluzione, è essenziale che le aree e le procedure siano improntate a criteri di flessibilità. Per **flessibilità** si intende la possibilità di modificare in tempi rapidi sia le dimensioni sia la destinazione d'uso di aree e stanze di stabulazione.

Indicazioni operative

Per quanto riguarda lo spazio necessario, al momento della progettazione, sarebbe importante conoscere in anticipo le specie ed il numero degli animali da ospitare, la tipologia dell'attività di ricerca che verrà svolta, il numero delle persone che utilizzeranno la struttura. Se ciò non fosse possibile si può operare in due modi diversi:

- 1) progettare una struttura che sia il più flessibile possibile, ad esempio stanze di stabulazione con caratteristiche tecniche tali da poter ospitare specie diverse in tempi diversi
- 2) progettare uno stabulario sovradimensionato di cui inizialmente utilizzare solo una parte, per poi attrezzare ed utilizzare la parte restante solo al momento in cui si presenterà l'esigenza di espandere la struttura



Figura 2. Corridoio stabulario

Lo stabulario, in funzione delle disponibilità sia economiche sia logistiche, può essere realizzato *ex novo* o ristrutturando ambienti già esistenti.

In quest'ultimo caso è necessario realizzare un progetto che tenga conto delle caratteristiche strutturali e tecniche degli ambienti esistenti. Nell'eventualità in cui siano presenti vincoli strutturali questi dovranno essere compensati dall'applicazione di adeguate procedure di lavoro.

Per realizzare un buon progetto è necessario un approccio basato sull'integrazione di competenze e professionalità (architetto, ingegnere, veterinario, ricercatore, responsabile di stabulario, responsabile del servizio di prevenzione e protezione, medico competente) in modo da mettere a frutto le rispettive esperienze modulando le soluzioni in funzione degli obblighi normativi e delle specifiche esigenze di ricerca.

Una delle prime decisioni da affrontare è stabilire se realizzare uno stabulario centralizzato o decentralizzato.

Per stabulario **centralizzato** si intende una struttura in cui lo spazio destinato a ospitare gli animali, i laboratori e le aree di servizio sono adiacenti, ad esempio sullo stesso piano.

Per stabulario **decentralizzato** si intende una struttura in cui lo spazio

E' consigliabile realizzare uno stabulario centralizzato in quanto la vicinanza delle aree di servizio, dei laboratori e degli spazi destinati ad ospitare gli animali può aiutare a con-

destinato a ospitare gli animali è separato dallo spazio di servizio e/o da quello sperimentale, ad esempio in edifici o piani diversi.



Figura 3. Area di lavaggio e sterilizzazione di uno stabulario

In fase di progettazione, particolare attenzione deve essere data a:

- accessibilità al luogo dove verrà costruita la struttura;
- caratteristiche idro-geologiche del luogo;
- condizioni climatiche;
- disponibilità di servizi quali acqua corrente, elettricità, telefono, raccolta e smaltimento di rifiuti, ecc.;
- presenza di edifici circostanti e livello di urbanizzazione;
- possibilità di espansione e modifiche del sito;
- sicurezza da atti vandalici, intromissioni accidentali, furti e atti terroristici.

tenere i costi di realizzazione e di gestione

Inoltre, le operazioni sono più efficienti, si ottimizza il tempo di lavoro e si riducono gli spostamenti degli animali e, quindi, i rischi di esposizione alle malattie

Qualora, si dovesse realizzare uno stabulario decentralizzato, particolare attenzione deve essere posta alle vie di accesso alle diverse aree facendo sì che corridoi e passaggi coperti siano sufficientemente ampi e climatizzati al fine di facilitare le procedure di movimentazione degli animali e delle attrezzature. Ovviamente la decentralizzazione ha costi più elevati e una minore sicurezza per le colonie animali da un punto di vista sanitario.

La progettazione di uno stabulario deve prevedere:

- aree di stabulazione degli animali, compresa la quarantena (Fig. 1);
- corridoi, prestanze, interblocchi (Fig. 2);
- aree dove lavare, sanitizzare ed eventualmente sterilizzare le attrezzature (Fig. 3);
- aree di ricevimento e stoccaggio materiali (mangime, segatura, attrezzature);
- aree attrezzate per il contenimento dei rifiuti speciali prima dello smaltimento;
- laboratori specializzati (di diagnostica, di chirurgia, di necropsia, per radiografie, per attività sperimentali, ecc.);
- spogliatoi, bagni e docce per il personale tecnico;
- uffici per il personale tecnico;
- area tecnica con una piccola officina meccanica (anche esterna);
- doppia porta di accesso allo stabulario e impianto per il controllo degli accessi alla struttura.

Inoltre, tutta l'impiantistica, sia elettrica che idraulica, dovrebbe essere progettata in modo tale da essere ispezionabile al di fuori delle stanze di stabulazione.

2.1 Aree deputate alla stabulazione degli animali

Nello stabilire le dimensioni delle stanze di stabulazione occorre tenere presente le specie da ospitare, la tipologia e l'entità delle attrezzature da impiegare e la frequenza dei flussi (movimentazione di materiale, personale e attrezzature). Ciò per permettere un utilizzo adeguato degli spazi e un'agevole libertà di movimento ai ricercatori e ai tecnici che utilizzano la struttura. E' necessario tenere in considerazione che, per motivi sanitari, i flussi di lavoro e i percorsi dei materiali e delle attrezzature devono sempre essere diretti dal "pulito" verso lo "sporco" e non viceversa.

I locali di permanenza degli animali devono garantire una rapida ed efficiente pulizia e sanitizzazione e, pertanto devono avere mura,

E' consigliabile progettare tutte le stanze di stabulazione con le stesse dimensioni e con le stesse caratteristiche tecniche-ambientali.

Per una buona gestione delle colonie animali e per la salvaguardia della salute degli operatori è importante che le aree destinate al personale siano separate da quelle per gli animali. Un rapporto ottimale fra lo spazio dedicato alla stabulazione degli animali e quello dedicato ai servizi è di circa 2:3.

Particolare attenzione va rivolta all'area di lavaggio che ha bisogno di uno spazio adeguato e sufficiente per la movimentazione delle attrezzature.

E' bene prevedere l'installazione di sistemi di controllo, per il personale autorizzato, attraverso l'uso di badge elettronici o codici oltre a sistemi anti-intrusione, con l'installazione di telecamere.

Una stanza ideale per ospitare animali di piccola taglia (topi, ratti, conigli, ecc.) dovrebbe essere di 3m x 6m x 3m h. Stanze di queste dimensioni sono consigliabili in quanto, in quanto, in caso di contaminazione da patogeni, sono più facilmente isolabili e sanitizzabili. Stanze più ampie (6/12m x 6m x 3m h)

soffitti e pavimenti resistenti, lisci, impermeabili e non scivolosi. Il pavimento deve sopportare, senza danni, anche il peso di installazioni pesanti e la struttura deve possedere sistemi che impediscano l'accesso ad animali indesiderabili.

I rivestimenti delle pareti e del pavimento devono avere il minor numero possibile di giunzioni.

Le porte delle stanze di stabulazione devono avere dimensioni tali da permettere il passaggio delle attrezzature (almeno 0,9-1 m x 2-2,1 m) ed essere fornite di uno spioncino o di una finestrella, per permettere ispezioni dall'esterno.

Sarebbe utile prevedere anche una stanza di "quarantena" in cui ospitare gli animali in arrivo da altre strutture. Il tempo di permanenza in questo locale dipende dai controlli sanitari che si intendono fare sugli animali in arrivo prima che vengano introdotti nello stabulario vero e proprio. La quarantena permette di minimizzare il rischio di contaminazioni di patogeni da parte degli animali appena ricevuti.

Generalmente le informazioni sullo stato sanitario (*report* sanitario) con cui arrivano gli animali sono sufficienti per stabilire gli interventi da adottare prima di introdurre gli animali nello stabulario (tempo di permanenza in quarantena, terapie, isolamento, riderivazione, ecc.). Le stanze di stabulazione e le zone dedicate ai servizi (lavaggio, stoccaggio materiali, ecc.) devono essere collegate mediante corridoi che possono essere multipli o singoli (Lipman 2007).

I corridoi multipli (Fig. 4) prevedono un flusso unidirezionale, una minore congestione e minimizzano il pericolo di contaminazione incrociata fra gli animali. **I corridoi singoli** (Fig. 5), invece, prevedono flussi in entrambe le direzioni, con maggiori rischi sanitari, a causa del passaggio di materiali sporchi e puliti nello stesso luogo e, pertanto, le procedure di lavoro devono essere estremamente rigorose al fine di contenere tali rischi.

In ogni caso i corridoi dovrebbero essere sufficientemente larghi da consentire e facilitare il movimento del personale e delle attrezzature. Fra due corridoi che si susseguono e che corrispondono ad aree sanitarie diverse, possono essere presenti degli interblocchi (*Airlocks*). Le stanze di stabulazione possono, invece, avere delle prestanze. Sia gli interblocchi sia le prestanze sono sistemi che consentono non solo di ridurre il rischio di diffusione di eventuali patogeni, contaminanti e allergeni, ma anche la rumorosità. Inoltre, le prestanze possono essere considerate anche come aree di preparazione del materiale che deve entrare nelle stanze di stabulazione.

Il personale tecnico che assiste agli impianti ha bisogno di accessi diretti ai sistemi di condizionamento, alle linee idriche, agli impianti elettrici e di gas, ecc. Ideale sarebbe l'accesso agli impianti tecnici

sono preferibili solo per l'allevamento e il mantenimento di grosse colonie animali.

I corridoi dovrebbero avere una larghezza compresa tra 1,80 e 2,50m.

attraverso un vano o piano tecnico, senza la necessità di entrare nelle stanze di stabulazione.

Per quanto riguarda i materiali, è consigliabile impiegare materiali resistenti e le attrezzature devono essere prive di angoli e rivestimenti superflui, che ne impediscano la pulizia e la sanitizzazione.

In particolare, sia i rivestimenti sia le attrezzature, devono essere resistenti all'acqua, alle alte temperature e all'uso continuativo di detergenti e disinfettanti. Le stanze dovrebbero essere a tenuta d'aria, isolabili e quindi sterilizzabili. Inoltre, il pavimento, le pareti e le porte devono essere il più possibile lisce e senza angoli al fine di facilitare un'adeguata pulizia. La rimozione dell'acqua deve essere rapida, pertanto nella progettazione bisogna porre attenzione alle pendenze dei pavimenti. Nelle stanze di stabulazione non dovrebbero essere presenti lucernai e finestre in quanto possono influenzare la temperatura ambientale e il fotoperiodo. Gli animali per uso sperimentale hanno bisogno di condizioni ambientali standard, pertanto si deve avere la possibilità di regolare e di controllare periodicamente la temperatura, l'umidità, i flussi d'aria, le pressioni differenziali e l'illuminazione (vedi cap. 3). Tutti gli ambienti e le attrezzature che contengono gli animali devono prevedere questi controlli (Lipman 2007).

Tutte le stanze di stabulazione dovrebbero essere regolate in modo autonomo per temperatura, pressione, luce ed umidità.

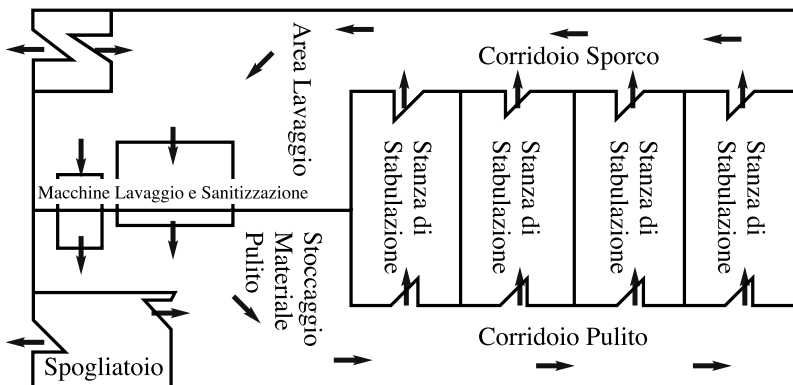


Figure 4. Schema di Stabulario con corridoi distinti "sporco" e "pulito"

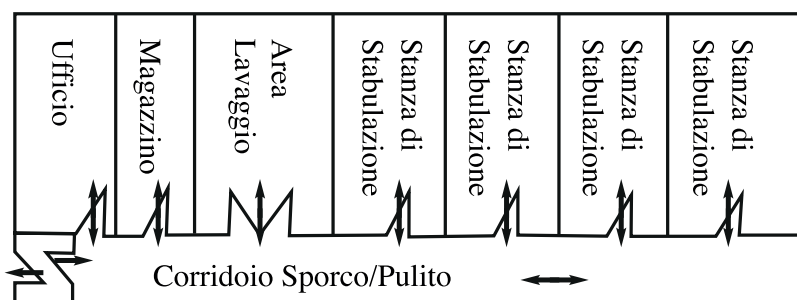


Figure 5. Schema di Stabulario con corridoio singolo

2.2 Aree deputate al lavaggio delle attrezzature e al ricevimento e stoccaggio dei materiali

L'area dove avviene il lavaggio, la sanitizzazione e la preparazione delle gabbie e di tutte le altre attrezzature, è una zona che ha una funzione strategica all'interno di uno stabulario, soprattutto se questo ospita un gran numero di animali.

Il punto critico nell'organizzazione di quest'area è garantire la netta separazione tra le attività "pulite" e le attività "sporche", al fine di evitare la possibile trasmissione di patogeni agli animali. Generalmente per il lavaggio delle gabbie, delle bottiglie di abbeverazione e delle altre attrezzature si utilizzano macchinari a tunnel (lavascaffali, lavabottiglie, autoclavi, ecc.) dotati di una doppia porta interbloccante: da un lato (area sporca) viene inserito il materiale usato che, lavato e sanitizzato, uscirà dal lato opposto (area pulita). In questo modo è assicurata una separazione fisica tra le due zone. Questa separazione è ulteriormente garantita se è previsto anche un gradiente differenziato di pressione (la zona pulita mantenuta positiva rispetto alla zona sporca).

Le dimensioni della zona di lavaggio devono essere adeguate al quantitativo di attrezzature che ogni giorno devono essere processate, alla movimentazione del materiale e al numero di persone che vi lavorano. In particolar modo la zona pulita deve essere provvista di locali in cui immagazzinare il materiale lavato, pronto per essere nuovamente utilizzato.

Nella progettazione di uno stabulario bisogna prevedere spazi adeguati per lo stoccaggio di materiale e di attrezzature (Lipman 2007). Tali spazi devono essere organizzati in modo da permettere di immagazzinare separatamente prodotti potenzialmente tossici,

Il pavimento della zona lavaggio deve essere dotato di un adeguato numero di scarichi in relazione alla grandezza dell'area in modo da permettere il defluire dell'acqua durante l'attività lavorativa o nel caso di eventuali allagamenti.

come ad esempio quelli per le pulizie, da quelli destinati agli animali, quali mangime e lettiere. Devono, inoltre, essere sufficientemente grandi per ospitare tutto il materiale necessario. Avere spazi adeguati aiuterà a scoraggiare il malcostume di appoggiare attrezzature lungo i corridoi di servizio, che devono essere tenuti sgombri sia per motivi di sicurezza, sia per facilitare la movimentazione del personale e delle attrezzature. Anche nei magazzini dovrebbero essere garantiti adeguati ricambi d'aria per assicurare il corretto mantenimento dei prodotti deperibili. I magazzini devono essere vicini all'area di ricevimento delle merci. Quest'area deve essere protetta da tettoie, spaziosa e progettata in modo da permettere operazioni di scarico facili e sicure, con rampe di accesso con poca pendenza, non sdruciolevoli e sufficientemente larghe.

2.3 *Classificazione degli animali e delle strutture in base alle loro caratteristiche microbiologiche*

Gli animali da laboratorio, a seconda della qualità microbiologica, sono generalmente classificati in 3 principali categorie:

- 1) animali *Convenzionali* (CV);
- 2) animali *Specific Pathogen Free* (SPF);
- 3) animali *Germ-Free* (GF).

Gli **animali Convenzionali** sono quelli in cui possiamo trovare l'intero *range* di microrganismi infettivi.

Gli **animali *Specific Pathogen Free*** sono quelli sicuramente privi di uno o più microrganismi stabiliti dalla comunità scientifica.

Gli **animali *Germ-Free***, ottenuti mediante riderivazione, sono privi di ogni microrganismo individuabile.

Pertanto, gli stabulari devono rispondere a criteri di gestione ed essere dotati di attrezzature diversificate in funzione della tipologia sanitaria degli animali che ospitano.

Stabulario convenzionale

In questo tipo di struttura, sicuramente la più diffusa, sono stabulati animali Convenzionali. Non sono previste procedure di accesso e di lavoro estremamente rigorose, ma si deve comunque garantire un buon livello sanitario, nella salvaguardia del benessere animale.

Gli utilizzatori dello stabulario convenzionale possono entrare a

La lista degli agenti patogeni che comunemente vengono ricercati nelle colonie animali è reperibile nei siti delle società internazionali che si occupano della scienza degli animali da laboratorio (FELASA, AALAS, ecc.).

diretto contatto con gli animali e la maggior parte dei materiali, inclusi cibo e acqua, non subisce processi particolari di sanitizzazione. E' sufficiente prevedere una buona pulizia delle attrezzature e dei locali e corrette procedure di lavoro. In questo tipo di struttura possono essere allevati anche elevate quantità di animali mantenendo costi contenuti.

Stabulario barrierato

In questa tipologia di stabulario si stabulano animali appartenenti alle categorie *Germ-Free* e *Specific Pathogen Free*. Questo tipo di stabulario prevede regole di accesso e di utilizzo più severe rispetto al precedente, in quanto si deve contenere al minimo il rischio di eventuali contaminazioni da microrganismi patogeni. Pertanto, gli utilizzatori non possono entrare a contatto diretto con gli animali, ma devono rivolgersi al personale addetto e tutti i materiali, inclusi cibo e acqua, devono subire processi di sterilizzazione. Questa condizione richiede personale particolarmente esperto e procedure di lavoro estremamente rigorose.

Per quanto riguarda gli animali *Germ-Free* è previsto un livello di contenimento sanitario superiore. A tal fine la stabulazione avviene all'interno di isolatori, strutture che funzionano come una barriera fisica assoluta che impedisce qualsiasi contatto dell'animale con l'esterno.

In questa tipologia di struttura si possono allevare anche elevate quantità di animali SPF ma, data la qualità sanitaria degli stessi, i costi saranno elevati. Per quanto riguarda gli animali GF, ai costi elevati si affianca anche una gestione complessa e, pertanto, si tende a limitare il numero di animali da allevare.

Negli isolatori si possono allevare anche animali "a flora definita". Con questa definizione si intendono quegli animali, originati mediante riderivazione e in cui sono stati inoculati pochi e ben definiti batteri (generalmente in numero inferiore a 12).

Esistono anche strutture miste (es. stabulari barrierati con un'area convenzionale o viceversa), le quali dovranno prevedere procedure di lavoro e attrezzature diversificate in relazione alle singole aree.

Strutture barrierate possono essere previste anche per animali immunodepressi e geneticamente modificati.

Nelle barriere o in sistemi isolati, tutti i materiali che entrano in contatto con gli animali sono sterili o altamente sanitizzati attraverso l'uso di lavaggi ad alte temperature, di autoclavi e/o sterilizzazione attraverso mezzi fisici e/o chimici

Nelle strutture miste la zona che separa la parte barrierata da quella convenzionale deve essere ad accesso limitato e prevedere particolari e rigorose procedure per l'ingresso.

Inoltre, nel caso in cui per queste due aree esistano servizi in comune, come ad es. la zona di lavaggio e la zona di stoccaggio del materiale, bisogna prevedere procedure di lavoro specifiche e separate per il materiale destinato alle differenti aree.



Figura 6. Stanza di stabulazione con gabbie ventilate



Figura 7. Stanza di stabulazione con gabbie con filtro

3 Regole di Stabulazione

Le regole di stabulazione fanno riferimento all'Allegato III del D.Lgs 26/2014 e alle Raccomandazioni Europee 2007/526/CE. Lo scopo principale della normativa è quello di garantire che gli animali da esperimento vengano adeguatamente trattati e non subiscano inutili dolori, sofferenze, angoscia e danni durevoli. A tale scopo, è indispensabile che tutti coloro che si occupano degli animali abbiano una buona conoscenza delle caratteristiche biologiche delle specie stabulate, al fine di soddisfare il più possibile i loro bisogni fisiologici e comportamentali.

Gli animali da esperimento devono essere stabulati seguendo le corrette indicazioni ambientali e alloggiati in gabbie che consentano loro una certa libertà di movimento. Si deve assicurare una corretta alimentazione, un'adeguata disponibilità di acqua e si devono garantire le cure necessarie.

3.1 Parametri ambientali delle stanze di stabulazione

Temperatura, Umidità, Pressione

Per quello che riguarda il controllo delle condizioni ambientali delle stanze in cui sono ospitati gli animali, particolare attenzione va rivolta alla temperatura, all'umidità ed alla ventilazione (Lipman 2007).

La temperatura e l'umidità devono rispettare le esigenze delle specie ospitate (per i roditori la temperatura ottimale è di 20-24°C, l'umidità deve essere mantenuta a 55±10%). Pertanto, l'impianto di condizionamento deve consentire sia il riscaldamento, sia il raffreddamento, oltre all'umidificazione e alla deumidificazione dell'aria.

L'aria va rinnovata costantemente e, a tal fine, si consigliano 15-20 r/ora. Per ambienti attrezzati con scaffali ventilati singolarmente o con isolatori sono sufficienti 8-10 r/ora, in quanto queste attrezzature già garantiscono al loro interno elevati ricambi d'aria (50-100 r/ora). La velocità dell'aria in una stanza non dovrebbe superare i 0,25 m/s misurata ad un'altezza di 1,8 m, soprattutto se sono utilizzate gabbie senza coperchi con panno filtro.

Per evitare la diffusione di patogeni trasmissibili attraverso l'aria e di altri contaminanti, il sistema di ventilazione dovrebbe fornire un gradiente di pressione differenziato tra i vari locali di uno stabulario, affinché le aree da proteggere, ad es. le stanze di stabulazione, abbiano una pressione diversa (positiva ovvero più alta) rispetto agli ambienti

Indicazioni operative

E' bene tener presente, nella fase di progettazione di uno stabulario, che le stanze di stabulazione dovrebbero avere la possibilità di una regolazione autonoma della T, della P, dell'umidità. Anche se questo può comportare costi più elevati.

Nello stabilire la temperatura e l'umidità delle stanze di stabulazione tenere sempre presente che all'interno delle gabbie la temperatura può essere superiore di qualche grado rispetto a quella della stanza, in funzione della posizione della gabbia nello scaffale, della presenza di coperchio, e del numero di animali presenti.

circostanti, ad es. i corridoi. In questo modo il flusso d'aria va dalla zona con il gradiente di pressione più alto alla zona con il gradiente più basso. Questo principio è da tenere presente non solo per le stanze di stabulazione vere e proprie, ma anche per tutti quei locali attigui in cui possono soggiornare gli animali (ad es. laboratori). Nella quarantena, dove ci sono animali potenzialmente portatori di patogeni, bisognerà applicare il principio inverso, in modo che in questa stanza il flusso dell'aria vada dall'esterno verso l'interno (la quarantena, quindi, deve essere a pressione più bassa dei locali limitrofi).

Illuminazione

L'illuminazione e la sua intensità possono avere effetti sulla fisiologia e sul comportamento degli animali da laboratorio. Nelle stanze di stabulazione, non essendoci una luce naturale, è necessario fornire un'illuminazione artificiale controllata, con uno spettro che sia il più vicino possibile a quello naturale e che garantisca agli animali un regolare ciclo giorno/notte. Negli stabulari, il ciclo di 12 h di luce e 12 h di buio è il più usato e questa periodicità è, generalmente, regolata da *timer* elettronici. Va ricordato che, la maggior parte degli animali da laboratorio sono notturni e, pertanto, la loro fase di sonno corrisponderebbe alla fase di attività degli operatori, da qui la necessità di invertire il loro ciclo di luce/buio.

Un'illuminazione di circa 325 lux, misurata ad 1,0 metro dal pavimento è considerata corretta per una buona stabulazione degli animali e adeguata anche per gli operatori che vi lavorano (ILAR 2011). Comunque, l'intensità luminosa a livello della gabbia non deve essere inferiore a 130 lux e non deve superare i 325 lux.

Rumore

E' oramai ben conosciuto l'effetto che il rumore può avere sia sulla fisiologia, sia sul comportamento, soprattutto riproduttivo, degli animali da laboratorio. L'esposizione a suoni che superano gli 85 dB può, infatti, avere effetti negativi sul benessere animale (Lipman 2007). E' opportuno considerare anche questo aspetto quando si scelgono e si utilizzano attrezzature che possono produrre rumori forti o improvvisi oppure ultrasuoni. L'udito di questi animali può percepire ultrasuoni maggiori di 20 kHz non udibili dall'orecchio umano e che possono essere prodotti da apparecchiature presenti nello stabulario. Infatti, attrezzature quali lavagabbie e lavabottiglie, computer, oscilloscopi, cappe a flusso laminare, ecc. possono generare un notevole aumento di rumori e/o di ultrasuoni. Pertanto, è bene che

Nei topi e ratti, quando l'umidità relativa resta inferiore al 40% per un lungo periodo di tempo, può svilupparsi, soprattutto negli individui giovani, il cosiddetto *ringtail*, cioè formazioni circolari localizzate sulla coda.

Ogni stanza di stabulazione dovrebbe essere dotata di un suo *timer* elettronico per il controllo del ciclo luce/buio.

E' bene installare, nelle stanze di stabulazione, anche lampade a raggi infrarossi. Ciò per non arrecare disturbo agli animali accendendo la luce della stanza. quando si devono svolgere attività umane durante il ciclo di buio degli animali.

In commercio sono facilmente reperibili, a costi anche contenuti, apparecchi portatili che permettono di misurare diversi parametri ambientali, tra cui anche il rumore. Va ricordato che nell'uomo la soglia di 85 dB è considerata pericolosa LEX=85dB (A) è il valore superiore di azione secondo il D.L. 81/08] e comporta l'adozione di una serie di misure protettive. L'Allegato III del D.Lgs 26/2014 stabilisce che il livello dei ru-

queste siano poste ad un'adeguata distanza dalle stanze che ospitano gli animali. E' da tener presente che anche gli scaffali ventilati producono un certo rumore e ciò deve essere considerato al momento della scelta delle attrezzature. Inoltre, allarmi, radio, e altre fonti di suono dovrebbero non essere usate nelle stanze di stabulazione, a meno che non facciano parte di un protocollo sperimentale o di un programma di arricchimento ambientale.

3.2 Attrezzature e materiali

Gabbie

In commercio esistono varie tipologie di attrezzature per la stabulazione che vanno dal classico scaffale con gabbie, con o senza coperchi dotati di panni filtro, a scaffali ventilati in cui ogni gabbia ha un circuito di ventilazione indipendente dalle altre (Fig. 6 e 7). Ovviamente la scelta delle attrezzature dipenderà dal contenimento microbiologico che si vuole mantenere e dalla disponibilità economica. Non ci si soffermerà sulla descrizione dettagliata delle varie attrezzature esistenti (ad es. tipologia, materiale, struttura, ecc.) in quanto queste informazioni sono oramai facilmente reperibili, ma si intende porre l'attenzione su alcuni aspetti pratici che spesso devono essere affrontati da chi gestisce uno stabulario.

In ambito scientifico, è ormai riconosciuta l'importanza di stabulare gli animali in gruppi sociali rispetto ad una stabulazione singola, la quale dovrebbe essere scelta solo se dettata da importanti motivi sanitari o irrinunciabili motivi sperimentali.

Al fine di garantire agli animali di espletare il più possibile i loro comportamenti specie-specifici, la gabbia dovrebbe avere dimensioni tali da garantire un'adeguata attività locomotoria ed essere fornita di strutture che ne aumentino la complessità al fine di permettere loro comportamenti quali il nascondersi, il costruire il nido, ecc. A tale scopo le attuali Raccomandazioni Europee danno indicazioni sulle superfici minime delle gabbie, che devono essere in relazione al numero degli animali presenti, al loro peso e allo stato fisiologico in cui si trovano, ad es. femmina con prole, ecc.

Lettiera

In commercio esistono varie tipologie di lettiera, generalmente ottenute da materiali vegetali quali legno, cotone e mais. La varietà

mori, compresi gli ultrasuoni, non deve nuocere al benessere degli animali. Gli stabilimenti si devono dotare di sistemi di allarme che emettano suoni al di fuori della gamma udibile dagli animali, se ciò non impedisce che siano udibili da parte degli esseri umani.

Nell'Allegato III del D.Lgs 26/2014 sono riportate le dimensioni delle gabbie e lo spazio disponibile per gli animali in base alla specie stabulata.

dipende anche dalla grandezza delle fibre, dal grado di assorbimento, dal peso, ecc. Comunemente viene usata la segatura che dovrebbe essere priva di polveri fini e di contaminanti microbici e chimici. Ci sono, però, lettieri che si presentano con forme e colore diversi, sfuse o raccolte in sacchetti di cellulosa, i quali hanno il duplice ruolo di contenitore e di carta per la costruzione del nido. Alcune lettieri sono più adatte per favorire comportamenti di “scavo” e altre per ridurre l’accumulo di ammoniaca. Non esiste, pertanto, una lettiera ideale e la scelta dipenderà dalle condizioni sperimentali e di gestione della struttura.

Un comportamento fondamentale per i roditori è la marcatura del territorio con l’urina. Pertanto, nelle operazioni di pulizia delle gabbie occorre tener presente l’importanza che gli odori rivestono per queste specie. La frequenza del cambio di lettiera dovrebbe essere stabilita in funzione del tipo di gabbia, del tipo di animale ospitato, del numero di animali e, compatibilmente, delle esigenze sperimentali.

Dieta

La composizione e le modalità con cui si somministra una dieta influenzano lo stato di salute, il metabolismo e le prestazioni degli animali da laboratorio. Ne deriva che la nutrizione sia un fattore estremamente importante nella stabulazione in quanto incide, non solo sul benessere dell’animale, ma anche sui risultati sperimentali. Solitamente gli animali hanno accesso libero al cibo durante tutta la giornata (somministrazione *ad libitum*), anche se si alimentano soprattutto durante la fase di buio.

In commercio sono disponibili varie tipologie di diete che rispondono alle più varie esigenze nutrizionali. Il fabbisogno energetico degli animali, infatti, non è sempre lo stesso, ma varia a seconda delle diverse condizioni fisiologiche in cui l’animale si trova. Ad esempio, durante l’accrescimento e l’allattamento, vi è una maggiore richiesta energetica rispetto a quella

degli animali adulti. Pertanto, una dieta di mantenimento per animali adulti è solitamente meno ricca in grassi (4-5%) rispetto ad una dieta utilizzata per animali in crescita o in fase di riproduzione (7-11%). Lo stesso vale anche per la quantità di proteine, che varia da 12-14% per animali in mantenimento a 17-19% per animali in riproduzione.

Inoltre, specie e ceppi diversi possono avere esigenze nutrizionali differenti. Ad esempio, nello stesso ceppo, a seconda che sia *inbred* o *outbred*, il bisogno minimo di alcuni nutrienti può essere diverso. Differenze nutrizionali possono esserci anche tra animali *Germ-Free* (GF), *Specific Pathogen Free* (SPF) e Convenzionali (CV). Ad esempio,

Chi utilizza animali SPF e GF dovrebbe usare lettiera autoclavata oppure irradiata sottovuoto.

E’ da tener presente che la lettiera sporca viene utilizzata per contaminare le gabbie che ospitano gli animali sentinella utilizzati per i controlli sanitari (vedi cap. 4.1)

Un topo mangia approssimativamente 3-4 g di cibo al giorno ed un ratto circa 10-20 g.

Tabelle nutrizionali sono disponibili sul sito: <http://www.informatics.jax.org/greenbook>

Ceppi **Inbred**: popolazione che deriva da un minimo di 20 generazioni consecutive di accoppiamenti tra fratelli e sorelle o

le vitamine K e B₁₂ vengono sintetizzate dalla flora intestinale dei ratti e dei topi convenzionali, per cui questi animali possono assumere quantità sufficienti dei due nutrimenti anche tramite la coprofagia. Questo comportamento, infatti, permette un più efficace assorbimento di nutrienti. Nel caso degli animali SPF è, invece, consigliabile integrare la dieta con una maggiore quantità di vitamine K e B, in quanto la loro microflora intestinale può contenere un corredo inadeguato di microrganismi in grado di sintetizzare le vitamine in questione. Pertanto, quando, si sceglie la dieta da utilizzare è bene valutare gli aspetti appena considerati.

Le diete per gli animali da laboratorio sono classificate in base al grado di purificazione degli ingredienti che le compongono (Lipman 2007). Sono definite come **diete a base di ingredienti naturali (diete standard)**, quelle di origine vegetale e animale, costituite da farine prevalentemente di cereali, quali orzo, mais, avena, soia, ecc; **diete purificate**, costituite da ingredienti purificati, ognuno dei quali apporta un solo principio nutritivo, ad esempio la caseina come fonte unica di proteine e il saccarosio o l'amido come fonte unica di carboidrati; **diete chimicamente definite**, costituite da ingredienti chimicamente puri, come gli aminoacidi (fonte di proteine), i mono e disaccardi (fonte di carboidrati) e gli acidi grassi purificati e i trigliceridi (fonte di lipidi).

Le diete standard sono le più economiche e le più ampiamente utilizzate. Le diete purificate sono un po' più costose, ma offrono il vantaggio di poter variare con grande precisione la concentrazione dei vari principi nutritivi e, pertanto, si prestano per essere utilizzate in studi volti ad indagare sulle carenze o sugli eccessi nutrizionali. Le diete chimicamente definite sono particolarmente costose ed utilizzate solo per studi specifici, quali ad esempio quelli sul metabolismo degli aminoacidi e degli acidi grassi.

Le diete in commercio si possono presentare sottoforma di *pellets*, farine o semi-liquide.

Il *pellet* costituisce la forma più utilizzata nell'alimentazione dei roditori sia per la sua praticità, sia per i costi contenuti.

Le farine sono più difficili da conservare in quanto sono soggette ad irrancidimento e a facili infestazioni da parassiti. Hanno, però, il vantaggio di poter aggiungervi ulteriori sostanze oltre a quelle della composizione di base.

Le diete semi-liquide o gel, invece, vengono utilizzate quasi esclusivamente quando ci sono precise indicazioni sperimentali, in quanto sono di difficile manipolazione, decisamente ingombranti per lo stoccaggio e presentano un maggior rischio di contaminazione batterica.

genitori e figli. Alla 21° generazione il coefficiente di *inbreeding* sarà tale che gli animali avranno una uniformità genetica e fenotipica quasi assoluta.

Inbreeding: incrocio di animali strettamente imparentati, è una tecnica di accoppiamento che aumenta l'omozigosi nella progenie in misura proporzionale al numero di generazioni conseguite

Ceppi **outbred:** popolazione in cui l'accoppiamento è casuale e si basa su schemi che minimizzano o addirittura eliminano il grado di *inbreeding*.

Per eradicare *Shyphacia* si utilizzano diete medicate con fenbendazolo (tra 150 e 200 mg/kg). Invece, diete medicate

In commercio sono disponibili anche **diete medicate**, le quali sono diete standard a cui sono stati aggiunti farmaci. Si sono dimostrate particolarmente efficaci nel trattamento per l'eradicazione di endoparassiti.

Acqua

Gli animali devono avere sempre a disposizione acqua fresca da bere. Il fabbisogno d'acqua dipende sia dalla composizione della dieta, in particolare dal suo contenuto idrico, sia dalle condizioni ambientali. L'acqua è somministrata *ad libitum* mediante sistemi di abbeverazione automatica oppure mediante bottiglie o sacchetti monouso. L'abbeverazione mediante bottiglie è la più diffusa sia per la facilità di gestione, sia per i costi contenuti. Inoltre, risulta particolarmente adatta anche per la somministrazione di farmaci.

L'acqua utilizzata per l'abbeverazione degli animali deve essere di buona qualità e, pertanto, è necessario prevedere sistemi per la purificazione e il controllo microbiologico, quali ad esempio l'acidificazione, la clorazione, i raggi ultravioletti, l'ozonizzazione e la filtrazione (Lipman 2007).

L'abbattimento della carica batterica con raggi ultravioletti è generalmente associato ad un altro sistema di trattamento dell'acqua, quale ad esempio la purificazione mediante osmosi inversa.

Dove se ne ravveda la necessità, l'acqua può essere anche autoclavata al fine di eliminare la maggior parte di batteri, spore, virus e funghi. E' da tener presente, però, che alcune tossine prodotte da batteri gram-negativi sono resistenti alla sterilizzazione in autoclave. Questo è particolarmente importante quando si lavora con animali *Germ-Free* o immunodeficienti.

L'acidificazione e la clorazione dell'acqua sono ancora tra i metodi più utilizzati negli stabulari. L'acidificazione si ottiene aggiungendo acido cloridrico oppure acido solforico all'acqua di abbeverazione, fino a raggiungere un pH tra 2.5 e 3.0. La clorazione si ottiene, invece, aggiungendo all'acqua ipoclorito di sodio. Anche se ancora non è stata trovata la concentrazione di cloro ottimale per l'acqua destinata all'abbeverazione dei topi e dei ratti, la concentrazione consigliata è compresa tra 0.5 e 10 ppm. Trattamenti di questo tipo risultano particolarmente efficaci per il controllo di *Pseudomonas aeruginosa* e altri batteri gram-negativi.

La filtrazione meccanica permette di eliminare particelle e microbi

contenenti, un mix di antibiotici, quali amoxicillina, metronidazolo e bismuto subcitrate vengono utilizzate nei topi per il trattamento di *Helicobacter hepaticus*.

Fabbisogno idrico: per il topo 15 ml/100g/die e per il ratto 10-12 ml/100g/die

Sono consigliati controlli periodici del pH e della durezza dell'acqua, oltre al monitoraggio microbiologico e chimico, al fine di controllare ed eliminare possibili contaminazioni che possono influenzare il benessere degli animali ed anche i risultati sperimentali.

Il cambio dell'acqua è in relazione alla grandezza delle bottiglie, al numero degli animali ospitati nella gabbia, alla frequenza del cambio-gabbie. In ogni caso si consiglia di non superare i 15 giorni in quanto dopo questo periodo si è riscontrato un aumento della carica batterica nell'acqua.

Comunque, è necessario effettuare un controllo giornaliero della disponibilità di acqua.

Nel lavaggio delle bottiglie e dei cappucci si deve prestare parti-

sulla base delle loro dimensioni. E' necessario, quindi, prevedere una serie di filtri via via più selettivi. I primi sono dei prefiltri che selezionano particelle in sospensione di 5-10 micron, quali sabbia, ruggine, ecc, mentre gli ultimi filtri selezionano particelle di 0.2 micron e servono ad impedire il passaggio di batteri.

Arricchimento ambientale

Oggi si condivide il principio che agli animali da laboratorio si debbano garantire spazi adeguati e con una certa complessità, ciò per permettere loro di esprimere comportamenti tipici della propria specie. La complessità dello spazio in cui vivere porta ad un maggior grado di controllo sull'ambiente e di conseguenza ad una riduzione di comportamenti legati allo stress, quali, ad esempio, le stereotipie. L'arricchimento ambientale dovrebbe essere appropriato e mirato ai bisogni della specie che si ospita e, pertanto, è necessario conoscere a fondo la sua biologia e la sua etologia. Nonostante l'arricchimento più importante rimanga la presenza di conspecifici nella propria gabbia, è indispensabile anche introdurre oggetti che possano stimolare comportamenti specie-specifici, promuovendo attività fisica, di foraggiamento, manipolativa e cognitiva. Ciò diventa irrinunciabile quando gli animali vengono stabulati singolarmente. Devono, perciò entrare a far parte della gabbia in cui un animale vive oggetti quali cassette-nido, materiale per la costruzione del nido, tunnel, legno da rosicchiare, ecc (Fig. 8). Questo materiale può essere sia "usa e getta", come ad esempio le cassette-nido in cartone, sia in materiale plastico con l'attenzione che possa essere resistente ad alte temperature, come quelle di un'autoclave. In commercio esiste una grande varietà di offerta anche se ancora i costi non sono molto contenuti.

colare attenzione alle ghiera in quanto sono i luoghi in cui più facilmente si annidano microrganismi.

L'Allegato III del D.Lgs 26/2014 indica la necessità dell'uso di arricchimenti ambientali per gli animali da laboratorio.

Vista l'importanza degli odori nei roditori, si consiglia di non cambiare la casetta-nido ad ogni pulizia della gabbia. In questo modo si riduce lo stress che l'animale affronta ad ogni cambio di lettiera in quanto, rimettendo la stessa casetta, l'animale ritrova l'odore a lui familiare.



Figura 8. Esempio di gabbia con arricchimento ambientale

3.3 Procedure di pulizia, sanitizzazione e sterilizzazione

La scelta dei metodi e della frequenza di pulizia e di disinfezione dei locali e delle attrezzature di uno stabulario dipendono da molti fattori, quali lo stato microbiologico degli animali che si intende mantenere (GF, SPF, CV), le caratteristiche fisiologiche e comportamentali delle specie ospitate, il tipo di attrezzature, il tipo di segatura, la temperatura e l'umidità ambientale, l'efficienza dell'impianto di condizionamento, ecc.

In questo ambito verranno date delle indicazioni generali su alcuni aspetti che quotidianamente vengono affrontati dallo staff che opera in uno stabulario, quali il cambio-gabbie e la pulizia delle attrezzature. La segatura deve essere cambiata con una frequenza adeguata a mantenere le gabbie pulite e asciutte. Non esiste una frequenza minima o ideale di cambio gabbie, ma dipende dal numero e dalle dimensioni degli animali ospitati, dal tipo di segatura, dal tipo e grandezza della gabbia, dalle condizioni in cui si trovano gli animali. La frequenza, pertanto, può essere molto variabile, si va dal cambio giornaliero a quello settimanale o ogni 15 giorni. E' consigliabile, comunque, evitare il cambio della lettiera nei giorni immediatamente precedenti e successivi al parto e durante il periodo dell'accoppiamento, per contenere lo stress degli animali.

Solitamente la lettiera viene cambiata 2 volte a settimana per le gabbie convenzionali e 1 volta a settimana (o ogni 15 giorni se poco affollate) per quelle ventilate.

Anche per il lavaggio delle gabbie e delle attrezzature, quali scaffali, bottiglie di abbeverazione, ecc., non esiste una regola generale, ma le procedure dipenderanno dalle caratteristiche dello stabulario. In generale, le gabbie vanno sostituite e lavate ad ogni cambio di lettiera, insieme alle bottiglie di abbeverazione. Alcuni tipi di gabbie e di scaffali potrebbero richiedere una frequenza minore di lavaggio e di disinfezione, ad esempio quando si hanno gabbie molto grandi con un piccolo numero di animali, oppure animali stabulati singolarmente in gabbie ventilate. Viceversa, potrebbe essere necessaria una frequenza maggiore nei casi in cui le gabbie sono densamente popolate, o gli animali sono trattati con procedure sperimentali che aumentano le deiezioni.

Per il lavaggio delle attrezzature attualmente esistono in commercio una grande varietà di macchinari. La maggior parte utilizzano cicli di lavaggio in cui è prevista un'alternanza di prodotti alcalini e acidi. I primi sono efficaci nel rimuovere i residui organici, gli altri sono necessari per la neutralizzazione dei prodotti alcalini che, se usati da soli, a lungo andare potrebbero rovinare le attrezzature. Le temperature devono essere intorno a 55-60°C per il lavaggio e più elevate, intorno agli 80°C, per il risciacquo. Al fine di abbattere o eliminare la carica batterica può essere indicato affiancare a questi cicli di lavaggio procedure di disinfezione e/o di sterilizzazione. La sterilizzazione di tutte le attrezzature e i materiali da introdurre nello stabulario può avvenire tramite l'uso di autoclavi, di gas (perossido di idrogeno, ossido di etilene, formaldeide), di radiazioni (irradiazione a raggi gamma a 2,5 Mrad) e a secco (T di 160°C per 120 minuti).

Tutti gli ambienti di uno stabulario quali le stanze di stabulazione, i magazzini, le stanze di lavaggio, i corridoi, ecc. devono essere puliti e disinfettati regolarmente utilizzando prodotti appropriati (Tab. 1 e 2). Si deve prevedere un'alternanza di prodotti al fine di evitare che i microrganismi sviluppino una resistenza ai principi attivi in essi contenuti. Sono consigliati prodotti a base di sali quaternari di ammonio, di potassio sodio monopersolfato, o prodotti a formulazione multiattiva (contenenti ad es. tensioattivi, acidi organici, agenti ossidanti, ecc.).

Al fine di ridurre gli effetti del calcio contenuto nell'acqua è consigliato alimentare la macchina di lavaggio con acqua adolcita o demineralizzata.

E' importante che sulla superficie delle gabbie e delle bottiglie in policarbonato che devono essere autoclavate, non ci siano residui di detergente poiché questi ad elevate temperature e a forte pressione possono corrodere il materiale causando la perdita di trasparenza ed il successivo degrado delle attrezzature.

Si consigliano cicli di autoclavatura ad una T di 121°C e per una durata non superiore ai 20 minuti.

L'efficacia della sterilizzazione dovrebbe essere periodicamente verificata, ad esempio effettuando analisi microbiologiche dei materiali sottoposti a tale processo (vedi cap. 4.2)

E' da tener presente che la maggior parte dei prodotti che si utilizzano nella pulizia e nella

Tabella 1. Esempio di procedure e prodotti per pulizia, deterzione e sanitizzazione degli ambienti

Prodotti	Frequenza d'uso	Concentrazioni d'uso
Idrossido di sodio e Ipoclorito di sodio	mensile/settimanale	3-5%
Sali quaternari d'ammonio	mensile/settimanale	3%
Potassio sodio monopersolfato, Sodio-alchil-benzen-sulfonato, Acido sulfamico	mensile	1%
1,3 Propandiammina, N-C10-C16-alchil derivati	mensile	1%

disinfezione possono essere tossici, infiammabili, corrosivi e, pertanto, devono essere previste adeguate procedure di utilizzo e di immagazzinamento.

Tabella 2. Esempio di procedure e prodotti per sterilizzazione degli ambienti

Prodotti	Frequenza d'uso	Modalità d'uso
Formaldeide	secondo esigenze	10%
Ac Peracetico	secondo esigenze	1-4%
Perossido d'idrogeno	secondo esigenze	400-500 ppm
Calore secco	secondo esigenze	160°C per 1h o 180°C per 30 minuti
Radiazioni ionizzanti	secondo esigenze	2,5 Mrad
Glutaraldeide	secondo esigenze	2-4%
Ipoclorito di sodio	secondo esigenze	20%
Vapore saturo (autoclave)	secondo esigenze	121 °C, 1atm
Ossido di etilene	secondo esigenze	200-800 mg/l a 30-60°C

E' buona norma posizionare dei tappetini adesivi in prossimità delle porte dello stabulario per diminuire la possibilità di introdurre patogeni attraverso le scarpe sporche.

3.4 *Controllo degli infestanti*

In uno stabulario devono essere previsti programmi di prevenzione, di controllo e di eliminazione di eventuali infestanti, quali roditori selvatici e insetti. La presenza di cibo e di altro materiale utilizzato per la stabulazione come la lettiera, la carta nido ecc., possono essere motivo di forte attrazione per gli animali che provengono dall'esterno. Pertanto, vanno individuate le possibili vie di accesso degli infestanti e previsti monitoraggi periodici degli ambienti, in particolare per quelle zone considerate a rischio, come ad esempio i magazzini per lo stoccaggio del mangime e della lettiera. Inoltre, devono essere predisposti interventi che mirino ad impedire l'accesso sia ai roditori, sia agli insetti. A tal fine si usano varie tecniche e tra queste le più utilizzate per i roditori sono le "barriere" di metallo e per gli insetti sono le griglie elettriche, i bulbi luminosi, la carta moschicida.

Per ridurre il rischio di infestazione, in particolare da roditori selvatici, si consiglia di poggiare i sacchi di mangime e di lettiera su bancali che permettano di tenere libero il pavimento ed accessibile per le pulizie.

4 Controlli Sanitari e Monitoraggio Ambientale in Stabulario

La salute degli animali da laboratorio, com'è noto, influenza il loro utilizzo sperimentale (Nicklas *et al.* 1999; 2002) e, pertanto, un adeguato programma di controllo sanitario (*Health Surveillance or Health Monitoring Program*) assume un'importanza fondamentale per ogni moderna struttura di ricerca. Lo stabulario è convenzionalmente definito come un ambiente controllato e ad accesso limitato (per personale, materiali, animali e loro prodotti), in cui l'infrastruttura, le procedure adottate e la sorveglianza esercitata, ne garantiscono la categoria di appartenenza (barrierato oppure convenzionale). L'attività di controllo sanitario principale è quella esercitata sugli animali e sui loro prodotti ed è una procedura critica ma necessaria per la valutazione dello stato di salute degli animali stessi; tuttavia non sono da sottovalutare i controlli indiretti delle condizioni igienico-sanitarie dell'ambiente attuati attraverso procedure di gestione del personale e delle attività correlate. Il programma sanitario deve essere disegnato per rilevare la presenza di agenti patogeni. Al di là dei programmi standard di sorveglianza sanitaria, dei saggi scelti, dei campionamenti e della frequenza dei test, sono sempre molto importanti, e a volte cruciali, le osservazioni giornaliere sugli animali da parte dei tecnici di stabulario dei ricercatori stessi.

In Europa la "Federation of European Laboratory Animal Science Associations" (FELASA) ha pubblicato un documento con le raccomandazioni per la realizzazione di programmi sanitari adeguati alle diverse specie (Mahaler *et al.* 2014). Questa guida è unificata a quelle in uso in altri continenti, inclusa la tipologia dei saggi e la frequenza dei test. Inoltre, è stato costituito un nuovo gruppo di lavoro congiunto "AALAS - FELASA working group on health monitoring of rodents", il cui intento è stato quello di armonizzare i programmi sanitari internazionali e quindi facilitare gli scambi di animali e dei loro prodotti (Pritchett-Corning KR *et al.*, 2014). Sebbene queste linee guida non abbiano valore normativo sono ormai comunemente riconosciute e utilizzate come riferimento dalla maggior parte degli Istituti nazionali e internazionali che utilizzano gli animali per i programmi scientifici di ricerca (Nicklas *et al.* 2010).

Indicazioni operative

Da stime Internazionali (Silverman J. 2002) si può calcolare che circa il 3% dell'intero budget dello stabulario dovrebbe essere destinato ai programmi di sorveglianza sanitaria.

Alcuni produttori di IVCs hanno messo a punto dei sistemi veloci, economici ed efficaci per il controllo e il rilevamento di microrganismi patogeni. Questi sistemi utilizzano l'aria esausta e il particolato degli scaffali ventilati che, tramite la PCR, portano alla rilevazione di eventuali patogeni presenti all'interno della gabbia e dell'ambiente dove vivono gli animali. Questa tecnica riduce anche l'impiego degli animali ai fini del monitoraggio sanitario.

4.1 Programma di controllo sanitario

Per sviluppare un efficace **programma di controllo sanitario** è necessario suddividere lo stabulario in **unità microbiologiche** (Mahaler *et al.* 2014). Per unità microbiologica si intende un ambiente separato, le cui caratteristiche microbiologiche sono omogenee e dove la potenziale esposizione degli animali agli agenti patogeni è praticamente la stessa (ad es. stabulario barrierato, stanza di stabulazione, gabbia di un IVC-rack, isolatore, ecc.). L'unità microbiologica determina il tipo, la frequenza e la numerosità del campionamento.

Un programma di controllo sanitario prevede la periodica esecuzione di test diagnostici sugli animali (Percy *et al.* 2007). La scelta degli animali da sottoporre alle analisi viene effettuata con criteri di tipo epidemiologico. Per eseguire i controlli sanitari delle colonie animali si possono utilizzare sia gli **animali residenti**, sia i cosiddetti **animali sentinella**. I primi sono rappresentati da animali appartenenti alle colonie sperimentali o di allevamento già presenti nello stabulario. Gli animali sentinella, invece, possono essere esterni, cioè acquistati per questo scopo da un fornitore autorizzato, oppure essere interni, cioè animali già presenti nello stabulario, ma dedicati solo a questa specifica funzione. In ogni caso, indipendentemente dal tipo di animali selezionati per il monitoraggio sanitario, essi devono avere il sistema immunitario giunto a maturazione (almeno 5-6 settimane di età), provenire da ceppi immunocompetenti ed essere stati adeguatamente esposti a tutti i possibili patogeni presenti nell'ambiente da controllare. Per quanto riguarda l'utilizzo degli animali sentinella esterni la scelta di questi rende il campionamento più flessibile, sia per la possibile selezione del ceppo più idoneo all'analisi, sia per la scelta della loro età. Le sentinelle devono essere posizionate nella parte più bassa dello scaffale e stabulate nelle stesse condizioni degli altri animali; inoltre devono essere regolarmente esposte ai patogeni attraverso il contatto con segatura esausta, cibo ed acqua prelevati a rotazione dalle altre gabbie secondo un programma predefinito. Per evitare "l'effetto diluizione", non si deve aggiungere alle gabbie delle sentinelle segatura pulita. Per utilizzare le sentinelle a fini diagnostici è necessario attendere minimo 6 settimane dall'inizio dell'esposizione per permettere lo sviluppo della risposta anticorpale. Un'esposizione più lunga (10-12 settimane) è consigliata per favorire l'infezione e/o la seroconversione di certi agenti come *Mycoplasma pulmonis* e *Pateurella Pneumotropica*.

È buona norma sottoporre a screening completo (parassitologia, batteriologia e sierologia) solo una parte delle sentinelle disponibili,

Gli animali sentinella devono provenire da un allevamento sicuro e controllato (meglio di categoria SPF-FELASA), per evitare che essi stessi siano sorgente di contaminazione. Devono anche essere rappresentativi della popolazione da controllare (es. topi mutanti con *background* B6 si associano a sentinelle B6).

Lo screening sanitario di animali ospitati in IVC-racks (Compton *et al.*, 2004) può essere poco rappresentativo delle condizioni della colonia. Infatti, ogni singola gabbia IVC può rappresentare una subunità microbiologica dell'intero rack e pertanto dovrebbero essere controllate più gabbie possibili per avere una stima ragionevole sullo stato sanitario dell'intera colonia. Anche l'applicazione della formula ILAR non è appropriata per definire la dimensione del campione da monitorare.

Le definizioni di *Area Specific Pathogen Free* (SPF) e *Specific and Opportunistic Pathogen Free* (SOPF) non si riferiscono solo ad aspetti strutturali e procedurali ma sono strettamente associate ad una specifica lista di esclusione.

Non tutti gli agenti si trasmet-

sostituendole con nuovi animali e lasciandoli a 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.

È da tenere presente che il contagio delle sentinelle mediante l'esposizione indiretta ai patogeni attraverso la segatura, il cibo e l'acqua può avvenire anche in tempi piuttosto lunghi, a causa delle caratteristiche di alcuni patogeni e dei "periodi finestra" di alcuni virus (es. circa 15 giorni per MHV).

Per tali motivi si associano strategie diverse con l'impiego e l'analisi contemporanea sia di animali sentinella sia di animali residenti. Nel caso in cui l'unità funzionale sia rappresentata da gabbie IVC o da isolatori è bene usare anche **sentinelle esterne di contatto**, cioè di animali introdotti direttamente nelle gabbie da controllare. Questi seguiranno i programmi di controllo sanitari previsti per gli altri animali sentinella.

Relativamente alla frequenza dei campionamenti, le raccomandazioni FELASA prevedono un programma di monitoraggio trimestrale per i patogeni prevalenti ed annuale per i patogeni non prevalenti e per quelli rari. Tale programma può essere variato in caso di sospette contaminazioni, di piani di eradicazione e di controllo di patogeni accertati, ma anche durante programmi di riderivazione embrionale o cesarea, per lotti di animali che dalla quarantena devono passare in stabulari barrierati o *clean-conventional*.

La numerosità campionaria (campione randomizzato) dipende dalla infettività dell'agente patogeno e dalla probabilità di errore del risultato secondo la formula:

$$S = \frac{\log p}{\log N}$$

in cui S è la dimensione del campione, p la probabilità dell'errore del risultato, N la percentuale di animali non contaminati. La formula si applica a popolazioni di animali di almeno 100 individui.

L'ampiezza del campionamento è abitualmente compresa tra 5 e 25 individui. Ad esempio, in presenza di un'infettività pari a circa il 30%, un campione di 10 soggetti (o sieri) per unità funzionale è sufficiente per identificare un positivo con un intervallo di confidenza del 95%. (Nicklas *et al.* 2002; ILAR 1976; Dubin *et al.* 1991).

to attraverso la segatura (ad es. LCMV, *Sendai virus*, *P. Pneumotropica*) o l'aria (ad es. *Helicobacter spp*, *mouse rotavirus*, *mouse parvovirus*) e perciò in alcuni casi, vanno usate le sentinelle di contatto.

Particolare attenzione deve essere posta per evitare le contaminazioni di colonie fondatrici (FC), d'espansione (EC) e di produzione (PC), specialmente se gli animali sono mantenuti in aree barrierate o protette.

Si sconsiglia l'uso di animali geneticamente modificati per screening sanitari, in quanto non sempre è possibile determinarne l'immunocompetenza. Inoltre alcuni di essi sono addirittura resistenti a certi patogeni (es. C57BL/6 per MPV e DBA/2 per MHV). Meglio usare animali *outbred* (CD1) che danno anche una buona risposta serologica. Oppure animali immunocompetenti eterozigoti di una colonia di animali nudi (nu/+).

Tenere presente che con l'età può diminuire la sensibilità alle infezioni (es. MPV, MHV).

Va tenuto in considerazione che la maggior parte degli agenti patogeni generano infezioni asintomatiche.

E' opportuno mantenere separate e sotto specifico controllo aree dello stabulario a diverso stato sanitario (procedure, animali, materiali e personale, ecc.).

Test diagnostici

Per evidenziare la presenza di agenti patogeni si possono utilizzare test diagnostici indiretti (analisi sierologiche) o diretti (analisi molecolari o colturali). Naturalmente solo la combinazione critica dei vari sistemi d'analisi, insieme all'anamnesi, anche storica, e alla sintomatologia clinica possono dare un quadro complessivo e più preciso dello stato sanitario delle colonie animali.

La sierologia (**metodi indiretti**) è generalmente effettuata per ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), HAI (*Hemagglutination inhibition test*), IFA (*Immunofluorescent Assay*) o MFIA (*Multiplexed Fluorometric Immunoassay*). Questi metodi sono consigliabili per screening preliminari di routine in quanto sono pratici, permettono di avere una panoramica immediata della presenza o meno di diversi patogeni, hanno un'elevata sensibilità e costi contenuti; di contro si possono verificare false positività per reazioni crociate dovute alla presenza di anticorpi che reagiscono con antigeni non sempre assolutamente specifici.

I **metodi diretti** sono rappresentati da esami colturali, parassitologici, necroscopici e istopatologici e da analisi molecolari quali la PCR. Gli esami colturali o l'analisi degli acidi nucleici mediante PCR, sono molto specifici e possono individuare un'infezione in atto. La PCR, in particolare, rileva direttamente il DNA/RNA dell'agente infettivo ed è particolarmente utile per identificare i virus e tutti gli agenti infettivi persistenti nei tessuti e anche quelli per cui non esiste una tecnica sierologica o colturale adeguata. I metodi diretti sono anche i metodi d'elezione per il rilievo di malattie in animali immunodepressi o immunodeficienti, in cui la risposta anticorpale è assente o molto scarsa. Inoltre, possono essere impiegati nei casi in cui non sia possibile rilevare risposte immunitarie o attendere il tempo necessario perché si sviluppino (sieroconversione minimo 14 giorni), come ad esempio nel caso di:

- animali in cui il sistema immunitario non è ancora completamente sviluppato;
- animali di nuovo arrivo (quarantena);
- animali esposti ad eventuale contaminazione (anche sperimentale);
- animali sospetti.

Gli esami necroscopici ed istopatologici, sebbene non rappresentino elementi fondamentali ai fini diagnostici, consentono comunque di

acquisire informazioni integrative e di conferma. Per questo sono abitualmente eseguiti.

I metodi parassitologici hanno un ruolo fondamentale nella ricerca di endo ed ectoparassiti. Relativamente agli endoparassiti, e soprattutto ai protozoi, questi possono essere ricercati nel piccolo e grande intestino mediante l'analisi microscopica delle mucose o del contenuto intestinale. Possono essere direttamente identificati al microscopio organismi quali la *Giardia* e lo *Spironucleus*, larve ed adulti di elminti ed anche flagellati come l'*Entamoeba*. Gli ectoparassiti (es. pulci, acari e pidocchi), invece, possono essere direttamente rilevati allo stereomicroscopio attraverso l'osservazione e l'analisi del pelo delle regioni cranica, facciale, del collo e del dorso degli animali. Nei casi dubbi, sia gli endo che gli ectoparassiti possono anche essere rilevati direttamente tramite analisi molecolari (es. PCR).

La ricerca diretta di batteri può essere eseguita tramite coltura utilizzando, quando possibile, terreni selettivi. Gli esami colturali consentono una precisa identificazione. Essi richiedono, però, il tempo necessario per lo sviluppo delle colture ed il rispetto delle condizioni specifiche (in particolare temperatura) per lo sviluppo dei batteri ricercati. Non si tratta, quindi, di metodi adatti a fornire risposte rapide. L'identificazione a livello di specie, se necessaria, è effettuata mediante sistemi di identificazione microbiologica manuale facilmente reperibili sul mercato (es. API o BBL).

4.2 Monitoraggio ambientale

Per garantire condizioni ambientali che minimizzino la possibilità di trasmissione e diffusione di agenti patogeni tra gli animali è necessario, in prima istanza, garantire le condizioni di microclima già descritte in precedenza (vedi cap. 3.1).

Il mantenimento di tali condizioni richiede interventi di verifica e manutenzione periodica. In particolare un elemento di criticità è rappresentato dalle condizioni dei filtri dell'aria. I filtri del condizionamento e i sistemi d'umidificazione devono essere regolarmente controllati e sostituiti, potendo rappresentare essi stessi, una volta saturati, un veicolo di contaminazione. (vedi cap. 8). E', inoltre, opportuno provvedere periodicamente alla verifica delle condizioni microbiologiche di tutti gli ambienti dello stabulario, compresi quelli forniti di filtri HEPA all'ingresso dell'impianto di condizionamento. Tali esami sono eseguiti utilizzando tamponi sterili, strisciati sulle superfici dei vari ambienti e delle attrezzature dello stabulario. I tamponi vengono poi piastrati su terreni di coltura per

verificarne l'eventuale crescita batterica. Laddove si presentino casi di contaminazione si può procedere a controlli più accurati e ad una successiva pulizia e sanitizzazione. In alternativa o in associazione si possono anche utilizzare sistemi SAS (*Surface Air System*), come sistemi ad aspirazione controllata di aria, che costituiscono un apparato strumentale completo per il monitoraggio microbiologico e il controllo dell'ambiente, delle procedure, dell'aria e superfici.

Analisi dei presidi per la sanitizzazione e la sterilizzazione

Numerosi sono i procedimenti e i controlli adottati, per sanitizzare e sterilizzare gli ambienti, le attrezzature, la strumentazione e i materiali impiegati. Per gli ambienti di lavoro, per le stanze degli animali e i corridoi, si adottano le consuete procedure di pulizia e detersione seguite da una sanitizzazione ed eventuale sterilizzazione con una periodicità che verrà stabilita a seconda delle caratteristiche dello stabulario. Si raccomanda una rotazione periodica dei disinfettanti per una migliore azione e per evitare l'insorgenza di fenomeni di resistenza da parte dei patogeni e degli opportunisti.

Esistono diverse procedure per realizzare una efficace sterilizzazione, in funzione delle dimensioni e della natura dei materiali da sottoporre a trattamento. Il materiale di grosse dimensioni e, laddove è possibile, anche una intera stanza di stabulazione sono sterilizzati per fumigazione usando un nebulizzatore a perossido d'idrogeno (H_2O_2) o alternativamente formaldeide al 25% per circa 15 minuti e lasciando agire i prodotti nella stanza sigillata per 24 ore prima di riaccendere la ventilazione. Materiali più piccoli possono essere sterilizzati utilizzando un'autoclave; il materiale che non può essere autoclavato (es. materiale plastico) e deve essere introdotto in uno stabulario barrierato viene passato all'interno di una *spray box* (camera stagna per sterilizzazione di prodotti), dove un nebulizzatore spruzza una soluzione di acido peracetico al 4% (o perossido d'idrogeno al 2.5 %) per circa 10 minuti. Infine, la *dip tank* rappresenta un ulteriore valido presidio per sterilizzare velocemente e far passare in aree barrierate materiale biologico quale embrioni e neonati. La *dip tank* è una vasca chiusa riempita con un liquido sterilizzante (es. soluzione clorata 300ppm) cambiato regolarmente. Prove di coltivazione del liquido sterilizzante sono effettuate settimanalmente per verificarne il potere sterilizzante.

Si ricorda, infine, che un altro metodo di sterilizzazione di materiale inerte che non può essere sterilizzato con altre metodiche, è costituito dal trattamento con raggi gamma (25 KGy), che è generalmente eseguito presso ditte specializzate.

Tutto il materiale introdotto in barriera deve essere sanitizzato o sterilizzato

Per la sterilizzazione dell'intera stanza di stabulazione dovrà essere verificato che l'impianto di ventilazione della stanza sia isolato da quello generale

Tutti i processi di sterilizzazione possono essere controllati mediante l'utilizzo di provette contenenti spore di *Bacillus subtilis* e *Bacillus stearothermophilus*, posizionate all'interno della stanza, delle attrezzature o di ciò che si vuole controllare. Successivamente il contenuto delle provette deve essere piastrato su terreni appositi per verificare l'assenza di crescita dei bacilli.

Si ricorda che 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 (vedi cap. 3.2).

4.3 Controllo del personale

Anche il personale può facilmente rappresentare una fonte di contaminazione per gli animali mantenuti negli stabulari. Il personale che lavora negli stabulari deve essere formato e fornito di mezzi di protezione individuale idonei. Queste precauzioni sono essenziali per evitare eventuali zoonosi (Newcomer *et al.* 2007) e per proteggere gli animali in quanto il personale può funzionare da vettore e trasmettere patogeni da un animale all'altro.

I dispositivi di protezione individuali, sempre necessari, devono essere scelti in funzione dell'attività svolta e dei rischi ad essa connessa.

Il personale che entra nelle barriere deve fare una doccia completa (aria o acqua) e indossare indumenti sterili e protettivi. È bene effettuare regolarmente controlli microbiologici dei DPI e delle docce utilizzate dal personale.

Si sconsiglia di far lavorare lo stesso personale in più strutture di stabulazione, indipendentemente dal loro livello sanitario. Devono comunque trascorrere almeno 72 ore tra la permanenza in uno stabulario e l'ingresso in un altro.

Se le condizioni operative lo consentono, la doccia ad acqua garantisce un livello di pulizia maggiore.

Il responsabile dello stabulario deve esercitare un'attenta vigilanza sul rispetto delle procedure adottate.

4.4 Interventi in caso di contaminazione da patogeni (Facility Outbreak)

I programmi sanitari degli stabulari e i relativi rapporti periodici (*Health Monitoring Report*) sono ormai da anni strumenti fondamentali per lo scambio e l'esportazione di animali verso altri Istituti. I risultati del controllo sanitario devono essere sempre rivisti e controllati dal responsabile dello stabulario che deve intervenire, in accordo con il veterinario designato per il D.Lgs 26/14, in caso di

condizioni di contaminazione o infezione, programmando la gestione dell'emergenza ed attuando un piano di intervento per l'eradicazione. In caso di positività, per prima cosa bisogna provvedere a confermarla o a smentirla. A tal fine, si provvede ad eseguire:

- un secondo test sullo stesso campione usando la stessa metodica;
- un esame sullo stesso campione utilizzando una metodica alternativa se disponibile (es. l'IFA se la prima analisi è stata effettuata con ELISA);
- un test su organi o tessuti tramite analisi molecolari come la PCR, anche per verificare se si tratti di un'infezione attiva o pregressa;
- un esame su campioni inviati ad un laboratorio d'analisi diverso dal primo.

Confermata la positività si procede al blocco di tutte le procedure dell'area interessata, in particolare dei flussi di animali, personale e materiali. Inoltre, sono effettuati test addizionali sulla stessa colonia e sulle colonie limitrofe, anche di aree sanitarie diverse, con campionamenti più numerosi concentrando l'attenzione sul patogeno in esame.

La fase successiva è quella dell'esame dei danni e dell'identificazione della sorgente della contaminazione. Spesso possono essere rilevati errori procedurali, carenze tecniche degli impianti o delle attrezzature che una volta sistemati prevengono successive contaminazioni. Identificati gli agenti, si può decidere se accettare la nuova situazione variando la lista d'esclusione dei patogeni, se eliminare il patogeno con un trattamento terapeutico specifico nel caso in cui ve ne siano di efficaci (esistono solo per i parassiti e per alcuni batteri) oppure se provvedere all'eradicazione di questo, tramite l'eliminazione totale degli animali contaminati ed esposti.

Nel caso in cui ciò non sia possibile per motivi sperimentali e/o per le caratteristiche di unicità del ceppo, è opportuno procedere almeno alla riduzione della popolazione animale interessata per minimizzare la trasmissione. In questi casi, gli animali non soppressi sono posti in quarantena, se possibile all'interno di isolatori, in pressione negativa. Per i ceppi di particolare rilievo scientifico, si può procedere alla riderivazione (derivazione cesarea o embrionale) e/o al congelamento degli embrioni e/o gameti in attesa del loro reimpianto. La procedura di *cross-fostering* può essere considerata come valida alternativa alla procedura di derivazione cesarea (Buxbaum *et al.*, 2011).

Dopo l'eliminazione delle colonie e dei materiali di consumo in uso (es. mangime, segatura, guanti, ecc.) è sempre opportuno svuotare gli

E' molto importante prestare attenzione alle corrette procedure di raccolta, trattamento, conservazione e spedizione dei campioni biologici su cui effettuare le analisi sanitarie.

Per exclusion list si intende la lista degli organismi patogeni e opportunisti che si considerano non compatibili con lo status sanitario dello stabulario (Pritchett-Corning *et al.* 2009).

Per derivazione cesarea (*Hysterectomy Derivation* - HD) si intende il prelievo, in condizioni di sterilità, dell'utero di un animale alla fine della gravidanza proveniente dalla colonia contaminata, la sua successiva apertura in condizioni di sterilità e l'affidamento dei neonati

ambienti, smontare tutte le attrezzature e sanitizzarne i componenti. In particolare, gli scaffali, le gabbie e gli accessori devono essere smontati, lavati e disinfettati o, ove possibile, sterilizzati. È importante che anche i filtri delle gabbie, del sistema di condizionamento e delle cappe vengano sostituiti con filtri nuovi.

Si procede, quindi, alla pulizia accurata, alla sanitizzazione e alla sterilizzazione degli ambienti interessati.

Al termine di questa fase, gli ambienti non devono essere utilizzati per almeno 7-10 giorni (assenza assoluta di animali e personale) applicando il cosiddetto vuoto sanitario.

Successivamente si procede ad una nuova pulizia e sanitizzazione dei locali.

Per verificare l'efficacia delle procedure adottate, prima di stabulare la nuova colonia animale, è buona norma introdurre nelle stanze animali sentinella da sottoporre a screening specifico dopo un adeguato periodo di permanenza. Nel caso di parassiti e batteri è bene effettuare anche analisi microbiologiche ambientali. 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 può stabilire la definitiva scomparsa del patogeno contaminante quando risultano negativi tutti i monitoraggi sanitari effettuati nei successivi 6 mesi nelle aree contaminate e in quelle limitrofe.

ad una madre adottiva non contaminata. Per derivazione embrionale (*Embryo-Derivation*, ED) si intende il prelievo in condizioni di sterilità degli embrioni, a qualunque stadio, da una o più madri della colonia contaminata. Dopo opportuno trattamento gli embrioni sono impiantati nell'ovidotto o nell'utero di una femmina non contaminata.

Per *cross-fostering* si intende l'affidamento entro le 24 ore dalla nascita e attraverso l'adozione di procedure in sterilità, dei neonati ad una madre adottiva non contaminata.

Per le contaminazioni virali è opportuno sterilizzare per fumigazione le aree contaminate

Schema del piano generale per affrontare una contaminazione da patogeni (*Outbreak*)

- 1) Conferma della positività (altri test, laboratorio indipendente)
- 2) Blocco delle procedure dello stabulario e delle esportazioni degli animali
- 3) Eliminazione degli animali presenti nelle aree contaminate e dei materiali di consumo; quarantena e/o riderivazione degli animali che, per motivi sperimentali, non possono essere eliminati
- 4) Smontaggio completo, sanitizzazione e sterilizzazione degli strumenti e delle attrezzature
- 5) Pulizia, sanitizzazione e sterilizzazione degli ambienti
- 6) Vuoto sanitario
- 7) Ripetizione della pulizia e della sanitizzazione degli ambienti
- 8) Test ambientali e su animali sentinella
- 9) Riposizionamento delle attrezzature
- 10) Ripopolamento della colonia
- 11) Test sanitari per la verifica dell'eradicazione dei patogeni

5 Anestesia, Analgesia e Eutanasia

Le procedure sperimentali possono provocare agli animali dolore, sofferenza e danni durevoli che, sia per ragioni etiche sia per ragioni scientifiche, devono essere ridotti al minimo o eliminati (Flecknell 2009; Fish *et al.* 2009; Flecknell and Waterman-Pearson 2000; Dennis 1997). Il dolore può influenzare il sistema nervoso centrale e quello periferico, separatamente oppure in maniera interconnessa. D'altra parte, il dolore, la sofferenza e i danni durevoli possono influenzare gli esperimenti sia direttamente sia indirettamente. Direttamente mediante il loro effetto sul sistema nervoso centrale o sulle risposte fisiologiche indotte (ad esempio l'aumento di temperatura e di pressione arteriosa, successive allo stimolo dannoso), indirettamente attraverso l'impiego di farmaci antidolorifici, usati come presidi terapeutici (l'eliminazione e il controllo del dolore possono ridurre l'intensità delle risposte fisiologiche di diversi sistemi). Questi aspetti devono essere sempre tenuti in debita considerazione nella pianificazione del progetto di ricerca, in quanto potrebbero influenzare le procedure sperimentali, al punto tale da rendere il modello animale prescelto non più idoneo. I progressi scientifici e tecnologici nel campo anestesilogico, si possono considerare come un aspetto essenziale nel *Refinement* (Russel and Burch 1959) (vedi cap. 17).

Anestesia e analgesia

L'anestesia può essere definita come uno stato d'insensibilità temporaneo e reversibile caratterizzato da notevole depressione della percezione sensoriale e delle risposte motorie e può provocare sia la perdita della coscienza (anestesia generale) sia della sensibilità di una regione anatomica determinata (anestesia locale e regionale). La scelta dell'anestesia nell'applicazione di un protocollo sperimentale dipende da diversi fattori, quali lo scopo della ricerca, la specie animale, il tipo e la durata della procedura.

Un anestetico ideale non esiste, tuttavia le caratteristiche peculiari dovrebbero essere le seguenti:

- semplicità di somministrazione;
- induzione e mantenimento di uno stato stabile (limitata variabilità dei principali parametri fisiologici), durevole e reversibile;
- capacità di garantire la sicurezza per gli animali e per il personale;

Indicazioni operative

Si consiglia sempre di valutare bene l'anestesia preliminarmente e di far ricorso ad uno specialista per la programmazione dello studio.

- capacità di non influenzare funzioni fisiologiche diverse dalla sensibilità ed eventualmente dallo stato di coscienza.

Pertanto, nella programmazione dell'esperimento, è sempre opportuno eseguire uno studio pilota per verificare tutte le condizioni sperimentali e le eventuali variabili.

In particolare è importante sottoporre un gruppo di animali ad uno studio preliminare per saggiare l'anestesia prescelta. Devono essere utilizzati animali della stessa specie, ceppo, età e sesso di quelli che saranno poi impiegati nello studio definitivo, mantenendo sempre le medesime condizioni sperimentali. E' da tener presente che, anche in ceppi diversi di topo (es. B6/J *inbred*, CD1 *outbred*), la risposta all'anestesia, il livello di profondità ed il successivo recupero possono essere molto differenti (Flecknell 2009; Fox 2007). Non ultimo, assume un ruolo importante anche l'esperienza del ricercatore e del personale tecnico coinvolto negli esperimenti.

5.1 Anestesia generale

Nell'anestesia generale si devono ottenere quattro condizioni principali, necessarie allo svolgimento dell'intervento chirurgico: analgesia, perdita di coscienza, soppressione dei riflessi e rilassamento muscolare.

Gli stadi dell'anestesia sono:

- Stadio I (analgesia senza amnesia): il diametro pupillare, la secrezione ghiandolare e il tono muscolare sono normali. La respirazione è regolare e l'animale è cosciente (piccoli interventi).
- Stadio II (eccitazione e amnesia): la respirazione è alterata (tachipnea) con presenza di midriasi e movimenti involontari e incoordinati. E' una fase transitoria e può essere migliorata dalla medicazione preanestetica.
- Stadio III (anestesia chirurgica): la capacità respiratoria è profonda e regolare, i riflessi sono completamente annullati e il tono della muscolatura scheletrica scompare rapidamente (respirazione profonda e addominale). Quando è troppo profonda, l'attività respiratoria è compromessa per riduzione dell'attività dei muscoli intercostali, fino

E' necessario scegliere con cura le sostanze da impiegare attraverso l'analisi delle loro caratteristiche farmacocinetiche, farmacodinamiche e tossicologiche, insieme agli effetti indotti dai metaboliti, che in alcune specie possono anche essere più attivi del composto parentale (ad es. i metaboliti del tramadolo, derivato oppioide usato principalmente per stati dolorosi acuti e cronici e dolori indotti da interventi chirurgici)

E' buona norma che animali provenienti da altri stabulari abbiano un sufficiente periodo di acclimatazione (min. 3-5 giorni), prima di essere sottoposti ad un intervento che preveda l'anestesia, e che debbano anche essere in perfette condizioni di salute.

alla completa paralisi. La respirazione diventa allora diaframmatica.

- Stadio IV (depressione centri bulbari): completa abolizione dei movimenti respiratori (morte dell'animale).

L'anestesia generale può essere indotta per iniezione endovenosa (I.V.), intramuscolare (I.M.) o intraperitoneale (I.P.) di uno o più farmaci (es. pentobarbitale, chetamina, medetomidina, ecc), o per inalazione di anestetici volatili (es., alotano, isoflurano, sevoflurano, ecc.).

La somministrazione di un solo farmaco è molto pratica ma non consente la regolazione dei vari stadi dell'anestesia in modo indipendente. L'uso di un'anestesia bilanciata (sostanze diverse in associazione), al contrario, permette una riduzione dei singoli dosaggi (minore tossicità e minori effetti collaterali indesiderati) e un miglior controllo delle componenti dell'anestesia. L'anestesia generale, durante la fase operatoria, prevede un'iniziale fase di induzione, che favorisce il contenimento dell'animale. Nel caso dell'anestesia iniettabile, i farmaci utilizzati hanno sia la funzione di indurre, sia di mantenere l'anestesia stessa. Nel caso, invece, dell'impiego dell'anestesia gassosa (Fig. 9), l'induzione può essere effettuata usando una camera di induzione, direttamente collegata al vaporizzatore, oppure tramite l'impiego di farmaci iniettabili. Comunque, indipendentemente dalla tipologia di induzione utilizzata, il mantenimento dell'anestesia avviene tramite la somministrazione di anestetici volatili attraverso maschere facciali e tracheotubi. Gli anestetici volatili consentono un migliore e più facile controllo sulla profondità dell'anestesia. Inoltre il recupero è molto rapido e sicuro, specialmente per anestesi di breve durata (inferiore a 30 min).

Naturalmente ci può essere un'interazione fra sostanze e, quindi, è indispensabile la conoscenza delle proprietà farmacologiche degli anestetici da impiegare

Ad esempio l'associazione fra chetamina e medetomidina, assicura un sicuro effetto analgesico.

L'anestesia gassosa (es. isoflurano, sevoflurano, ecc.) rappresenta il migliore compromesso fra l'anestesia e la necessità di non alterare eccessivamente i parametri fisiologici. Sono da sostituire, a fronte di una sicurezza e stabilità scarsa e di numerosi effetti collaterali, sostanze di "storico impiego" come ad esempio l'etere (esplosivo ed irritante per le vie respiratorie; potenzia il blocco neuro muscolare se associato ad alcuni antibiotici come gli aminoglicosidi), il tribromoetano (irritante per il peritoneo, frequentemente mortale con somministrazioni ripetute), il cloralosio (provoca ileo paralitico, atonie, stipsi e ostruzione intestinale con alta mortalità), l'uretano (epatotossico, può provocare edema polmonare per la lentissima eliminazione,



Figura 9. Apparato per anestesia gassosa

5.2 Anestesia locale

Gli anestetici cosiddetti “locali” agiscono sul tessuto nervoso bloccando la conduzione dell’impulso. Ad esempio, possono essere applicati sulla superficie della cornea o della congiuntiva per anestetizzare una parte dell’occhio oppure possono essere utilizzati per anestetizzare le mucose e facilitare il passaggio di cateteri e sonde. Gli anestetici locali possono anche essere iniettati nei tessuti per anestetizzare la regione anatomica a valle. Al fine di assicurare un efficace blocco nervoso è richiesta una consistente preparazione ed esperienza dell’operatore e il loro uso non è facile specialmente nei roditori per la difficoltà d’immobilizzazione dell’animale. Gli effetti più evidenti si hanno attraverso l’infiltrazione del farmaco nel liquido cerebrospinale (anestesia spinale) o nello spazio epidurale (anestesia epidurale) e ottenendo un’anestesia di porzioni più estese del corpo. Nell’anestesia locale, l’animale rimane cosciente ed è solamente soppressa la sensibilità in una regione prestabilita. In funzione della tecnica utilizzata e delle modalità di somministrazione, si possono distinguere:

cancerogeno in diverse specie animali).

È anche necessario tenere in debito conto il rischio potenziale per il personale esposto (vedi cap.7)

- Anestesia di superficie - applicazione di uno spray anestetico locale, di una soluzione o d'una crema sulla pelle o sulla membrana di una mucosa. L'effetto è breve e limitato all'area del contatto.
- Infiltrazione locale - iniezione di un anestetico locale nei tessuti da anestetizzare. È compresa con la precedente nell'anestesia topica.
- Blocco di ramo o del nervo periferico - iniezione sottocutanea di un anestetico locale nell'area attorno al ramo da anestetizzare.
- Anestesia del plesso - iniezione di un anestetico locale nella vicinanza di un nodo nervoso (plesso) spesso all'interno di un compartimento del tessuto che limita la diffusione della sostanza alla zona interessata. L'effetto anestetico si estende alle aree nervose di molti o tutti i nervi che originano dal plesso.
- Anestesia epidurale regionale - un anestetico locale è iniettato nello spazio epidurale dove agisce sulle radici del nervo spinale. A seconda del sito d'iniezione e del volume di sostanza iniettata, l'area anestetizzata varia da limitate zone dell'addome o del petto fino a vaste regioni del corpo.
- Anestesia spinale regionale - un anestetico locale è iniettato nel liquido cerebrospinale, solitamente all'altezza della spina lombare (nella parte bassa del dorso), dove agisce sulle radici del nervo spinale. L'anestesia che ne deriva si estende solitamente dalle gambe fino all'addome o al petto.
- Anestesia locale delle cavità corporee (es. anestesia intrapleurica, intrarticolare, ecc.) - un anestetico locale è iniettato in una cavità del corpo.

L'effetto dell'anestesia locale può essere potenziato e migliorato attraverso l'uso di coadiuvanti come vasocostrittori e sedativi.

Sostanze di comune impiego come anestetici locali sono la prilocaina, la lidocaina, la novocaina, ecc.

Pratica anestesiológica

L'anestesia, sia essa generale, sia locale, è comunemente suddivisa in tre fasi: pre-operatoria (preparazione dell'animale e del campo operatorio, somministrazione di farmaci per la medicazione pre-anestetica, ecc.), operatoria (somministrazione dei farmaci anestetici

Prima di indurre l'anestesia è necessario preparare gli strumenti chirurgici, verificare il loro corretto funzionamento e predisporre anche farmaci di emergenza.

e monitoraggio) e post-operatoria (risveglio e recupero delle funzioni vitali).

In alcuni casi è previsto l'uso di una medicazione pre-anestetica per minimizzare lo stress (sedativi e tranquillanti: es. xilazina, diazepam), ridurre le secrezioni bronchiali e salivari (agenti anticolinergici: es. atropina) e rilassare il tono muscolare (miorilassanti: es. medetomidina).

E' da tenere in debita considerazione che molti dei sedativi e dei tranquillanti hanno un limitato o nullo effetto analgesico; analogamente molti degli anestetici generali iniettabili, come ad es. la Chetamina, hanno solo un'azione analgesica centrale. Va rilevato che per i roditori, non c'è bisogno né di digiuno pre-operatorio né di medicazione pre-anestetica.

E' necessario inoltre prevedere anche un idoneo protocollo di cure post-operatorie, finalizzato al controllo e al ripristino delle normali condizioni d'idratazione, di temperatura corporea, e dell'equilibrio acido-base.

La valutazione della profondità dell'anestesia si effettua attraverso l'analisi del ritmo e della profondità degli atti respiratori e cardiaci e della pressione sanguigna. A questo scopo vengono anche valutati diversi riflessi quali: il palpebrale, il podale, della deglutizione, il caudale, l'auricolare e di raddrizzamento. Le eventuali complicazioni dell'anestesia (es. depressione e arresto della respirazione, arresto cardiaco, ecc.), vanno previste e controllate attraverso l'uso di sostanze appropriate (es. doxapram, adrenalina, ecc.). Le procedure di controllo delle funzioni vitali sono necessarie anche nel periodo post-operatorio, allo scopo di verificare il corretto recupero funzionale dell'animale. E' particolarmente importante garantire il mantenimento della temperatura corporea, specialmente in animali di piccola taglia (rapporto peso/volume sfavorevole), attraverso l'uso di incubatori, gabbie termostate, materassini riscaldabili e lampade termiche.

Il dolore operatorio può essere eliminato tramite l'uso appropriato di un buon protocollo anestesilogico (Flecknell and Waterman-Pearson, 2000) Il dolore e la sofferenza post-operatori possono essere controllate tramite l'uso di analgesici, come gli oppiacei (es. morfina, buprenorfina, ecc.) e i FANS (es. ibuprofene, piroxicam, flunixin). Nei giorni successivi all'intervento gli animali devono essere monitorati frequentemente.

La depressione respiratoria causata dagli anestetici induce ipercapnia e acidosi metabolica, pertanto si consiglia la somministrazione di soluzione fisiologica o meglio tampone e ringer lattato, per favorire il ripristino delle condizioni, soprattutto con anestesia prolungata (> 1h), quando si palesano clinicamente gli effetti secondari avversi.

Nei roditori la perdita del riflesso di raddrizzamento e del riflesso podale, rappresentano i principali riflessi valutabili e sono i maggiormente usati.

Dopo l'intervento l'animale perde circa il 20% del peso corporeo, che va reintegrato con liquidi ed alimentazione subito disponibile. Pertanto si consiglia di aggiungere del mangime bagnato o gel idonei direttamente nella gabbia.

Prestare particolare attenzione ai traumi inferti dalla griglia e dagli altri animali durante la fase del risveglio, ad esempio in interventi con l'applicazione di protesi esterne o con l'applicazione di punti di sutura esterni.

5.3 Eutanasia

Il D.Lgs 26/14 prevede che, durante o al termine della procedura, nel caso in cui gli animali non fossero più necessari, o quando permangano condizioni di dolore, sofferenza, distress o danno prolungato moderati o intensi, questi possano essere sacrificati attraverso l'eutanasia. Gli animali possono essere sacrificati anche per altri scopi scientifici come la raccolta di organi e tessuti o analisi istopatologiche. Il metodo applicato deve essere etico, umanitario, affidabile, rapido ed efficace. La facilità di esecuzione non prescinde dalla formazione del personale preposto a tale funzione. Le metodologie di eutanasia sono divise principalmente in due gruppi: metodi farmaco-chimici (es. sovradosaggio di anestetico generale, CO₂, ecc.) e metodi meccanici e fisici (es. dislocazione cervicale, decapitazione, ecc.). La conferma della morte deve avvenire tramite la valutazione della perdita delle funzioni vitali. Uno dei metodi più utilizzati è l'uso di CO₂ con l'impiego di contenitori appositi, provvisti di manometro e collegati ad una bombola di anidride carbonica. Non esiste un modo "ideale" di uccisione di animali con CO₂, sia la saturazione preventiva della camera, sia il riempimento con concentrazioni crescenti, possono causare problemi di benessere. Il tasso ottimale riempimento della camera è incerto. Tuttavia l'impiego di gas 100% CO₂ ad una portata del 20% del volume della camera per minuto, ha dimostrato di produrre perdita di coscienza senza evidenza di dolore, ma non senza evidenza di dispnea (*Newcastle Consensus Meeting on Carbon Dioxide Euthanasia of Laboratory Animals 2006*). La morte viene poi accelerata esponendo gli animali per almeno 10-15 min ad una concentrazione di CO₂ del 100%. I neonati sono particolarmente resistenti all'ipossia indotta dalla CO₂, che a tal motivo va evitata, preferendo altri metodi quali la decapitazione o la dislocazione cervicale.

Esistono degli apparecchi in commercio che somministrano gas anestetico e successivamente, una volta che l'animale si è addormentato, una miscela di CO₂ e aria, che sono ideali per salvaguardare il benessere animale.

6 Importazione, Scambi e Trasporto Animali

Gli animali utilizzati per scopi scientifici devono essere allevati in condizioni ambientali standardizzate adatte sia a garantire i loro bisogni fisiologici sia a minimizzare la variabilità sperimentale. Eventuali cambiamenti dell'ambiente possono, infatti, influenzare i loro parametri fisiologici e conseguentemente influire sui dati sperimentali, oltre a pregiudicare lo stato di salute degli animali stessi. Tipica situazione in cui ciò si può verificare è il trasferimento degli animali da uno stabulario ad un altro, dove possono esserci condizioni ambientali e di stabulazione anche differenti (Kim *et al.* 2006; Guidance on the transport; White *et al.* 2010; LAR 2011).

Il trasporto può anche esporre gli animali a possibili incidenti, dovuti ad incuria, disorganizzazione e scarsa esperienza (es. mortalità degli animali per eccesso di calore o di freddo durante i trasferimenti da un corriere a un altro) e a possibili contaminazioni di patogeni con cui potrebbero venire in contatto (es. trasporto promiscuo di animali o trasporto di animali di diverse categorie sanitarie). Inoltre alcuni ceppi di animali, in particolare quelli con difetti del sistema immunitario e/o provenienti da stabulari barrierati (vedi cap. 2.3), possono diventare particolarmente sensibili all'azione dei patogeni. Questa depressione delle difese immunitarie e organiche in generale può anche determinare l'insorgenza di patogeni opportunisti con conseguente stato di malattia. Gli animali da trasportare devono essere sani e certificati tali dal veterinario dello stabilimento e dalle autorità sanitarie veterinarie competenti localmente (ASL). Animali malati e in condizioni fisiologiche rischiose (es. animali cardiopatici, animali in gravidanza) non dovrebbero essere trasportati, se non per motivi diagnostici e terapeutici o per scopi scientifici e di ricerca che giustifichino il rischio aggravato di mortalità durante il trasporto di animali non idonei (secondo il D.Lgs 26/14, 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). E' fatto divieto di trasporto di animali infettati sperimentalmente.

Nella fase di **spedizione** degli animali verso altri Istituti o stabulari, il responsabile dello stabulario deve supervisionare l'organizzazione e la corretta attuazione delle procedure previste per quest'operazione, mentre il veterinario deve controllare tutte le pratiche di pertinenza veterinaria (es. documenti sanitari e stato di salute degli animali) e il personale addetto agli animali deve eseguire correttamente le istruzioni impartite (es. preparare gli animali nelle scatole di trasporto). Il Responsabile dello stabulario che spedisce gli animali e

Indicazioni operative

Si consiglia di spedire gli animali i primi giorni della settimana, per essere sicuri che l'arrivo avvenga durante un giorno lavorativo e di evitare trasferimenti d'animali nei mesi estivi, per non esporli ad alte temperature in fasi difficilmente controllabili (es. attesa del carico nell'aeromobile).

Il trasporto di animali vivi è un procedimento rischioso e problematico. Coinvolge diversi soggetti, come il trasportatore, le autorità sanitarie locali, il personale dello stabulario, ecc., per questo la sua organizzazione è molto più efficiente e sicura se si possono avere tutte le informazioni necessarie in anticipo.

Nell'organizzazione del trasporto, si raccomanda di coinvolgere sempre tutte le figure professionali interessate nella gestione dello stabulario quali il responsabile dello stabulario, il veterinario, i ricercatori, ecc.

lo spedizioniere devono verificare preliminarmente tutti i dettagli del trasporto stesso, ma anche i documenti necessari (specialmente per le spedizioni internazionali), affinché le operazioni possano svolgersi nel minor tempo possibile e in totale sicurezza (Dir. 77/489/CEE; 81/389/CEE e *International Air Transport Association*, IATA – www.iata.org). Una volta predisposta la spedizione, il responsabile dello stabulario che riceve gli animali (o persona incaricata) deve essere contattato da chi spedisce al fine di comunicargli le informazioni relative a: numero, sesso, età degli animali in arrivo, data di spedizione prevista, certificati sanitari.

Una volta preparati tutti i documenti sanitari e amministrativi, le scatole di trasporto (Fig.10) possono essere assemblate e cordate dai relativi cartellini identificativi, nella stanza di stabulazione stessa o in una stanza apposita. A parte si preparano la lettiera e il cibo. Durante l'imballo e il trasporto devono anche essere garantite condizioni climatiche idonee, cibo e acqua sufficienti per tutto il tempo previsto per il trasferimento da uno stabulario ad un altro. In condizioni di viaggio breve (massimo 1 giorno) si può usare della dieta standard eventualmente inumidita. In condizioni di viaggio standard (1-3 giorni) si usa il gel da trasporto. In condizioni di viaggio molto lungo (5-6 giorni) al gel da viaggio va aggiunta della dieta standard. Indipendentemente dalla durata del viaggio, all'esterno del box, sul lato laterale lungo, si deve apporre un adesivo con una freccia che indichi qual è la parte superiore e quale la base della scatola. Sulla parte superiore, si deve apporre un adesivo riportante "non ostruire i filtri" e l'etichetta "topi vivi" (IATA). Queste procedure, indispensabili per il trasporto aereo, sono raccomandabili non solo per i trasporti internazionali ma anche per quelli nazionali via terra.

Nella fase d'**importazione** degli animali, che possono provenire da altri Istituti, da Stabilimenti fornitori, da Stabilimenti utilizzatori, ecc. il Responsabile dello stabulario deve supervisionare l'organizzazione e la corretta attuazione delle procedure previste per quest'operazione:

- raccolta di tutte le informazioni concernenti sesso, età e numero degli animali;
- data prevista d'arrivo;
- certificati sanitari (certificato di buona salute degli animali, rilasciato dal veterinario dello stabulario di partenza e il rapporto sanitario).

Ovviamente è bene controllare che l'indirizzo della struttura ricevente, sia corretto e completo. Il veterinario deve controllare tutte le pratiche di pertinenza veterinaria (es. documenti sanitari e stato di salute degli animali).

Si raccomanda sempre di affidarsi a corrieri professionali e di comprovata affidabilità: l'esperienza è molto importante nel trasporto degli animali.

E' consigliabile avere sempre una persona di riferimento a cui chiedere tutte le informazioni inerenti il trasferimento degli animali.

Nel cartellino identificativo vanno riportate le informazioni che riguardano il ceppo, sesso, età, ecc.

Insieme ai cartellini identificativi, vanno inseriti negli scomparti anche un modulo per l'identificazione degli animali (es. massimo 5 topi per scomparto dello stesso sesso o 1 coppia in riproduzione) ed un foglio informazioni relative al contenitore di spedizione, al mezzo d'alimentazione e di idratazione da viaggio.

In base ai criteri adottati nella struttura ricevente gli animali in arrivo saranno trasferiti o nello stabulario o in area quarantena. Nel caso in cui gli animali devono sostare in quarantena, il personale addetto provvederà ad identificare gli animali, a predisporre gli alloggiamenti e a eseguire tutte le altre procedure previste per quell'area. L'uso dell'area quarantena, che dovrebbe essere predisposta in locali isolati, ha lo scopo di proteggere da possibili infezioni sia gli animali già presenti nello stabulario sia il personale che vi lavora.

All'arrivo, le scatole di trasporto devono essere aperte rapidamente e gli animali trasferiti in gabbie pulite con acqua fresca e cibo a volontà. Gli animali di nuovo arrivo devono essere mantenuti in acclimatazione e osservazione per circa 3-5 giorni. Gli animali non idonei (malati, debilitati, con segni di lotta o d'alopecia, ecc.) devono essere tenuti in osservazione, curati dal veterinario designato o da una persona competente e qualora ce ne fosse la necessità, possono essere anche soppressi (D.Lgs 26/14). Una volta che gli animali sono giunti a destinazione, deve essere informato chi ha spedito dell'avvenuto arrivo e delle condizioni degli animali importati. Devono essere anche valutate le condizioni di mantenimento, la strategia d'accoppiamento ed eventuali controlli sanitari aggiuntivi da effettuare. I dati degli animali importati devono essere registrati negli appositi registri degli animali, previa identificazione (Vedi Cap. 14).



Figura 10. Scatola di trasporto per animali

Alla ricezione delle scatole di trasporto, è consigliabile nebulizzare la loro superficie esterna con un disinfettante (ad esempio una soluzione di sali quaternari di ammonio oppure alcool 70%) e trasportarle nella stanza di alloggiamento.

Aprire la scatola con tutte le precauzioni, controllarne il contenuto (in riferimento ai documenti) e verificare lo stato di nutrizione e di salute degli animali stessi. E' consigliabile stabulare gli animali per il periodo di acclimatazione mantenendoli nelle stesse condizioni sociali del trasporto (singoli, in coppia ecc).

E' bene conservare i cartellini originali fino a sistemazione definitiva degli animali.

In funzione delle condizioni specifiche dei singoli stabulari, è opportuno che il Responsabile dello stabulario, d'intesa con il Veterinario responsabile, individui una lista di agenti patogeni ed opportunisti che si considerano non compatibili con lo status sanitario dello stabulario (es. agenti di zoonosi - LCMV & Hantaan Virus;

In caso di scambi di animali per la via aerea, la procedura è più complessa e va dedicata particolare attenzione ai regolamenti della *International Air Transport Association* già citati e alla legislazione pubblica veterinaria del Paese da cui provengono gli animali e del paese che li riceve

In fase di **spedizione** degli animali verso altri Istituti o Stabulari, oltre a quanto indicato nella precedente sezione, chi spedisce (ad esempio il Responsabile dello stabulario), deve fornire alla società incaricata del trasporto le seguenti informazioni:

- specie e ceppo;
- numero e sesso degli animali
- identificazione e certificati sanitari.
- tali informazioni, unitamente alle seguenti:
- numero di "air-way bill" (AWB);
- compagnia aerea, numero di volo e orario di partenza;
- data ed orario d'arrivo.

Tutti questi dati devono essere comunicati alla struttura ricevente direttamente dalla società o da colui che spedisce.

Nella fase d'**importazione** degli animali, oltre a quanto già descritto, deve essere spedito alle autorità veterinarie di dogana competenti, entro il giorno precedente all'arrivo degli animali, il fax con le informazioni necessarie all'importazione d'animali vivi da Paesi stranieri appartenenti alla EU. (Posti d'Ispezione Frontaliera – PIF: Uffici veterinari periferici del Ministero della Salute e gli Uffici Veterinari per gli Adempimenti degli obblighi Comunitari – UVAC: Uffici periferici del Ministero della Salute, competenti per paesi comunitari. Tali informazioni potranno essere fornite, a seconda degli accordi di spedizione, dalla società di trasporto o da chi riceve.

agenti molto virulenti – Sendai;
agenti virulenti che hanno gravi conseguenze sui programmi di ricerca – MPV, MHV, ecc.).

Sul sito del Ministero della salute è possibile trovare l'elenco degli indirizzi dei PIF e degli UVAC di ogni Regione.

Parte terza

Individuazione e Prevenzione dei Rischi

Parte terza

Individuazione e Prevenzione dei Rischi

7 Prevenzione nei luoghi di lavoro: cenni normativi e concetti generali

Indicazioni operative

Il D.Lgs 81/08 è il Testo Unico in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro. La sua emanazione si è resa necessaria per consentire un approccio coerente ed integrato in un settore in cui si è sviluppato nel corso degli anni un apparato normativo complesso, articolato e non sempre coerente.

La normativa italiana al riguardo, ha, tra i suoi capisaldi storici, il D.P.R. n. 547 del 1955 sulla prevenzione degli infortuni ed il D.P.R. 303 del 1956 sull'igiene del lavoro, a cui si sono aggiunte successivamente numerosissime altre disposizioni su aspetti particolari. L'istituzione della Comunità Europea ha dato un impulso significativo all'armonizzazione delle legislazioni degli Stati membri relativamente ai requisiti minimi di tutela della salute e della sicurezza dei lavoratori tramite l'emanazione di varie Direttive. Il principale provvedimento di recepimento di queste direttive è stato il D.Lgs 626/94 che, negli anni, ha subito varie modifiche e integrazioni fino alla sua abrogazione e sostituzione con l'attuale D.Lgs 81/08.

Questo Decreto, così come il precedente D.Lgs 626/94, delinea un quadro di organizzazione del sistema di prevenzione nei luoghi di lavoro definendo le figure che vi partecipano ed i rispettivi ruoli. Il ruolo centrale è assunto dal Datore di Lavoro cui spetta la valutazione dei rischi nonché la scelta e l'adozione delle misure di prevenzione e protezione. In queste azioni viene supportato dal Servizio di Prevenzione e Protezione e dal medico competente. L'esito della valutazione e le azioni intraprese sono riportate in un documento, il documento di valutazione dei rischi (DVR), che deve essere rielaborato in occasione di introduzione di nuove lavorazioni, di modifiche rilevanti dei processi lavorativi, in seguito a infortuni significativi e tenuto aggiornato in relazione al grado di evoluzione delle conoscenze

tecniche. Ad esempio, nella realizzazione di uno stabulario è richiesta una specifica valutazione dei rischi. In caso di modifiche sostanziali di uno stabulario già operante, inoltre, è necessaria una revisione del documento preesistente. I compiti di vigilanza e monitoraggio sulla corretta applicazione delle procedure e delle misure adottate spetta ai preposti (Per preposto si intende chi *“sovrintende all’attività lavorativa e garantisce l’attuazione delle direttive ricevute, controllandone la corretta esecuzione da parte dei lavoratori ed esercitando un funzionale potere di iniziativa”*), fermo restando la responsabilità di ciascun lavoratore ad ottemperare alle disposizioni date e a seguire le linee di comportamento che vengono loro indicate dai dirigenti e dal datore di lavoro (se necessario tramite specifico addestramento).

Una delle caratteristiche innovative del D.Lgs 81/08 è rappresentata dall’obbligo per il datore di lavoro, in caso di committenza di lavoro a terzi, di promuovere la cooperazione ed il coordinamento nella gestione dei rischi che possono derivare da interferenze tra le sue attività e quelle effettuate dalla ditta, come si verifica, ad esempio, nel caso di una ditta esterna che effettua interventi di manutenzione o di pulizia all’interno dello stabulario. La valutazione di tali rischi e le misure adottate devono essere riportate nel Documento Unico di Valutazione dei Rischi da Interferenza (D.U.V.R.I.).

Il D.Lgs 81/08, inoltre, ribadisce gli obblighi per progettisti, fabbricanti, fornitori ed installatori affinché le loro forniture (attrezzature, macchine, impianti, dispositivi di protezione) siano rispondenti alle disposizioni legislative e regolamentari vigenti e garantiscano le condizioni di sicurezza per il committente e gli utilizzatori.

Dal punto di vista dei modelli di organizzazione e di gestione dei rischi sui luoghi di lavoro, il D.Lgs 81/08 ribadisce e rafforza l’importanza attribuita alla partecipazione dei lavoratori e al ruolo dei Rappresentanti dei Lavoratori per la Sicurezza (RLS). D’altro canto, è sottolineata, ancor più che in passato, la funzione essenziale della formazione per garantire l’adozione di comportamenti e pratiche sicuri e viene confermato l’obbligo per il datore di lavoro di provvedere all’informazione, formazione e addestramento del personale. Per la prima volta, poi, è esplicitamente auspicata l’adozione e l’attuazione di un sistema organizzativo strutturato, esplicito, implementabile e sottoposto a riesame in occasione di malfunzionamenti secondo la filosofia che ispira i sistemi di qualità aziendali.

Prima di descrivere le caratteristiche di alcuni rischi che possono essere presenti negli stabulari è opportuno richiamare alcuni concetti per evitare confusione nella terminologia adottata.

In primo luogo è necessario ricordare la differenza tra pericolo e rischio. Per **pericolo** (*hazard*) si intende una proprietà o qualità intrinseca di un determinato fattore che ha la potenzialità di causare danni. Ad esempio, una sostanza fortemente acida o l'elettricità sono di per sé pericolose in quanto dotate di capacità lesive.

Il termine **rischio** (*risk*), invece, esprime la probabilità di raggiungimento del livello potenziale di danno nelle condizioni di impiego o di esposizione ad un determinato fattore. In altre parole, il rischio indica la probabilità che il fattore lesivo determini un danno (infortunio e/o malattia professionale) alle persone esposte. Rifacendoci all'esempio riportato, il rischio esprime la probabilità di avere un danno da caustico o di essere folgorati in una specifica condizione. La stima di questa probabilità è funzione della intensità dell'agente di rischio e del tempo di esposizione del lavoratore a quell'agente.

Comunemente i rischi sono classificati in tre gruppi:

- a) Rischi per la sicurezza da cui possono derivare infortuni sul lavoro (danni alla persona dovuti a "causa violenta in occasione di lavoro". Rischi dovuti a strutture, macchine, energia elettrica, sostanze pericolose, incendio e esplosione)
- b) Rischi per la salute che agiscono in maniera diluita nel tempo da cui possono derivare malattie professionali (Rischi da polveri inorganiche o organiche, agenti chimici, fisici, biologici)
- c) Rischi per la sicurezza e la salute (Rischi dovuti all'organizzazione del lavoro, a fattori psicologici, ergonomici, a condizioni di lavoro difficili).

La valutazione dei rischi tiene conto della frequenza di accadimento degli eventi e della gravità delle loro conseguenze (entità del danno alle persone). Essa utilizza i dati statistico-epidemiologici sugli infortuni e le malattie professionali e richiede l'analisi dei processi lavorativi, la conoscenza delle materie prime utilizzate, l'esame degli impianti, delle macchine e delle attrezzature di lavoro, delle condizioni degli ambienti di lavoro, la valutazione delle interazioni tra i vari individui e le eventuali esposizioni a fattori di rischio non direttamente connessi con il processo lavorativo (come nel caso di esposizione non deliberata ad agenti biologici da parte di chi opera in stabulari ed allevamenti).

Le misure di prevenzione sono volte a minimizzare la probabilità di accadimento di un evento dannoso mentre quelle di protezione sono finalizzate a ridurre gli effetti sulle persone.

Nell'ambito delle azioni per la valutazione e la gestione dei rischi un contributo importante può essere fornito dall'analisi degli errori (Errore: fallimento nella pianificazione e/o nell'esecuzione di una sequenza di azioni che può determinare eventi avversi) a partire dagli eventi da essi provocati e, in particolare, dei cosiddetti quasi eventi (*near miss*) ovvero di quelli 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. Per questo motivo è buona norma registrare sistematicamente i *near miss* e analizzarli periodicamente coinvolgendo in questo processo le figure con esperienza e competenza specifica (nel nostro caso, ad esempio, il responsabile e i tecnici dello stabulario).

Infine, è fondamentale ricordare che la prevenzione nei luoghi di lavoro richiede efficienti flussi informativi tra le varie figure. Ad esempio, è indispensabile che il Servizio di Prevenzione e Protezione della struttura sappia quali attività sono svolte nello stabulario, con quali animali, se sono utilizzati microorganismi patogeni e venga sempre informato di eventuali modifiche. D'altra parte è importante che il personale dello stabulario e gli utilizzatori dei servizi conoscano le procedure da adottare in caso di emergenza (chi avvisare, le vie di fuga, i punti di raccolta...); o, ancora, che all'ufficio acquisti siano descritte le caratteristiche che devono avere i dispositivi di protezione da acquistare in relazione alle attività svolte (ad esempio i guanti, calzature particolari ecc.) o a condizioni particolari degli operatori (come l'allergia al lattice). È auspicabile, analogamente a quanto avviene in tutti i sistemi di qualità, che i flussi informativi siano esplicitati definendo chi deve alimentarli e a chi sono diretti onde evitare conseguenze anche gravi per omissioni o imprecisioni. Molti rischi che possono essere individuati negli stabulari, hanno caratteristiche comuni con quelli di altri ambienti di ricerca. A questi si aggiungono alcuni rischi specifici legati all'attività con gli animali.

8 Impianti e gestione delle emergenze

In questo paragrafo sono descritti i principali rischi correlati agli impianti e sono considerati gli aspetti strutturali (percorsi, vie di esodo, compartimentazione degli ambienti...) che hanno rilevanza anche per la gestione delle situazioni di emergenza. L'art. 62 del D.Lgs 81/08 definisce come luoghi di lavoro *“i luoghi destinati a ospitare posti di lavoro, ubicati all'interno dell'azienda o unità produttiva, nonché ogni altro luogo di pertinenza dell'azienda o dell'unità produttiva accessibile al lavoratore nell'ambito del proprio lavoro”*. Ne deriva che lo stabulario deve essere considerato un luogo di lavoro.

I requisiti di salute e di sicurezza dei luoghi di lavoro sono indicati nell'allegato IV del D.Lgs 81/08. Un elemento da considerare, vista l'ubicazione di alcuni stabulari, è che la legge vieta di destinare al lavoro locali chiusi sotterranei o semisotterranei salvo quando ricorrano particolari esigenze tecniche. Ovviamente, in quest'ultimo caso, bisogna assicurare idonee condizioni di aerazione, di illuminazione e di microclima. Le caratteristiche relative alle uscite e alle scale di emergenza nonché ai percorsi di esodo sono descritte nell'allegato III del D.M. 10 marzo 1998 *“Criteri generali di sicurezza antincendio e per la gestione dell'emergenza nei luoghi di lavoro”*.

Seguendo gli abituali criteri di classificazione dei rischi, quelli considerati in questa sezione sono prevalentemente rischi per la sicurezza ovvero che hanno a che fare con l'insorgenza di eventi accidentali infortunistici quali la folgorazione, la caduta per la presenza di superfici scivolose (ad es. per pulizie o sversamenti), i traumi e le ustioni da crolli, incendi e altre situazioni di emergenza.

Impianti

L'impianto elettrico deve essere realizzato secondo le norme CEI, con grado di isolamento adeguato all'ambiente e alle attività che vi si svolgono.

Gli impianti elettrici in tutte le loro parti (dalle cabine ai quadri, dalle spine agli interruttori) devono essere costruiti in modo tale da impedire qualsiasi contatto accidentale con elementi sotto tensione (ovvero in cui vi è un passaggio di corrente elettrica) ed essere oggetto di accurata manutenzione. Il materiale utilizzato deve essere conforme alle vigenti normative per le specifiche applicazioni. L'installazione deve essere eseguita da ditte qualificate che devono rilasciare il certificato di conformità (DM 22 gennaio 2008, n. 37).

Indicazioni operative

È bene istituire procedure per la registrazione degli interventi di manutenzione programmata sugli impianti. Va, perciò, identificata una persona addetta all'allestimento e all'aggiornamento di un registro (diverso per ogni impianto) su cui riportare in maniera sintetica data e tipo di intervento effettuato (ad es. verifica degli interruttori magneto-termici, sostituzione dei filtri, revisione dei sensori di fumo...)

Gli impianti devono essere sottoposti ad interventi di manutenzione programmata.

I cavi elettrici devono possedere idonea resistenza (termica, meccanica, ecc.) rispetto alle condizioni di lavoro del luogo in cui sono ubicati.

Gli interruttori posti nei quadri elettrici devono indicare in maniera univoca e chiara i circuiti ai quali si riferiscono.

Per ogni linea elettrica devono essere installati interruttori differenziali con taratura inferiore a quella dei quadri generali.

Nel caso di utilizzazione di utensili portatili e apparecchiature mobili alimentati a bassa tensione (max 220 V) non è consentito avere cavi che costituiscono intralci o grovigli. In caso di lavori svolti in luoghi bagnati o molto umidi e a contatto di grosse masse metalliche, gli utensili elettrici portatili utilizzati devono essere provvisti di un isolamento supplementare. Questo è identificato da un simbolo costituito da due quadrati concentrici (doppio isolamento) apposto sull'utensile.

I pozzetti dell'impianto di terra devono essere ben evidenziati e facilmente ispezionabili. Ogni cinque anni (ridotti a due nei casi di maggior rischio di incendio), l'impianto di messa a terra deve essere sottoposto a controllo che può essere richiesto alle ASL o ad altri organismi autorizzati. Il D.P.R. n° 462 del 22/10/2001, infatti, individua i datori di lavoro quale soggetto su cui grava l'obbligo di garantire tali verifiche periodiche avvalendosi, a propria discrezione, dell'ASL, dell'ARPA o di Organismi abilitati dal Ministero delle Attività Produttive.

I livelli di illuminamento devono garantire lo svolgimento delle attività previste nei vari locali secondo i principi di ergonomia della visione.

È opportuno prevedere la presenza di fonti di illuminazione che consentano la continuazione delle attività in caso di interruzione dell'alimentazione di rete senza sostanziali cambiamenti (illuminazione di riserva).

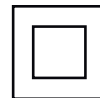
Nel caso siano utilizzati gas tossici o infiammabili all'interno dello stabulario (quali il metano, idrocarburi gassosi, CO₂) o azoto gassoso dovrà essere valutata l'adozione di sistemi di rilevazione con

È importante acquisire e conservare gli schemi degli impianti e farli aggiornare in occasione di eventuali interventi di modifica.

Deve essere evitato l'impiego di derivazioni multiple, prolunghe e "aggiustamenti" posticci di qualsiasi tipo.

In caso di lavori sull'impianto che possano comportare modifiche nelle corrispondenze tra interruttore e circuito di riferimento, verificare sempre, al loro termine, l'esattezza delle indicazioni riportate.

Simbolo del doppio isolamento



Simbolo di messa a terra



Le norme UNI classificano gli intervalli di illuminamento in lux necessari in funzione delle aree e dei compiti da svolgere.

Le valvole di intercettazione devono essere installate immediatamente a valle del punto di

allarme ottico-acustico eventualmente capaci di attivare valvole di intercettazione per interrompere il flusso.

Nel caso in cui siano presenti sale operatorie deve essere considerata anche la possibile esposizione ai gas anestetici (essenzialmente raggruppabili in due gruppi:

non alogenati, come il protossido d'azoto e alogenati come l'isofluorano e il sevofluorano). L'emissione nell'ambiente può essere dovuta a perdite accidentali di gas dall'apparecchio di anestesia e dal circuito. È, perciò, indispensabile eseguire un controllo periodico e una regolare manutenzione delle apparecchiature e dei sistemi di aspirazione e convogliamento all'esterno dei gas. Un fattore di protezione è costituito dai ricambi d'aria del locale. È auspicabile che i sistemi di ventilazione dell'ambiente garantiscano il ricambio di 12 – 15 volumi/ora (senza ricircolo).

Inoltre, è opportuno verificare la qualità dell'aria secondo metodologie scelte in funzione dell'attività svolta.

L'impianto di climatizzazione attraverso il controllo della ventilazione e dei parametri microclimatici deve garantire condizioni di benessere sia per l'operatore sia per gli animali contribuendo altresì a ridurre la possibilità di contaminazione per via aerea diminuendo la permanenza di eventuali microorganismi in sospensione.

Pertanto, è opportuno prevedere per i locali di stabulazione e di permanenza del personale, la possibilità di regolare la temperatura in modo indipendente locale per locale o, almeno per aree omogenee, entro *range* predefiniti (vedi cap. 3.1). Deve essere valutata l'esigenza di un controllo indipendente dell'umidità per una parte dei locali in funzione delle esigenze di stabulazione.

Nei locali di pulitura e lavaggio l'impianto di ventilazione deve essere sufficientemente potente da eliminare calore ed umidità eccessivi.

L'impianto deve essere sottoposto ad interventi di manutenzione programmata che prevedano anche la verifica delle portate (immissione e estrazione). È anche opportuno programmare valutazioni periodiche dei parametri microclimatici.

ingresso del gas o all'esterno e devono richiedere un'azione manuale di riarmo verso la posizione di aperto.

Non impiegare sistemi di erogazione degli anestetici gassosi privi di sistema di scarico o di idoneo filtraggio.

Caricare i vaporizzatori in ambienti ventilati.

Assicurarsi sempre



che i connettori siano fissati bene.

Oltre a misure ambientali periodiche è possibile utilizzare campionatori fissi; campionatori personali; analizzatori in continuo ed in tempo reale.

Nel caso di utilizzazione di microrganismi di classe 3 o 4 andranno rispettate le misure indicate nel paragrafo dedicato (vedi cap. 11).

Fare attenzione al carico termico interno degli ambienti ad esempio evitando presenze eccessive di strumentazione. In caso di locali che vengono dedicati a funzioni diverse da quelle iniziali (ad es. da magazzino a locale per frigoriferi), verificare l'adeguatezza dell'impianto esistente.

Deve essere prevista un'alimentazione di emergenza dell'impianto in modo da evitare l'interruzione del suo funzionamento in caso di *black out* elettrico.

Emergenze

La gestione delle situazioni di emergenza richiede, in primo luogo, che, in caso di pericolo, tutti i posti di lavoro debbano poter essere evacuati rapidamente e in condizioni di sicurezza secondo le procedure descritte nel piano di emergenza. Ciò richiede che i percorsi siano privi di ostacoli, adeguati alle attività e al numero di persone presenti. È necessario considerare anche i problemi derivanti dalla presenza di operatori con problemi di deambulazione. Le vie di fuga devono essere segnalate chiaramente e identificabili anche in caso di mancanza dell'illuminazione normale tramite idonea illuminazione di sicurezza. Le planimetrie con l'indicazione delle vie di fuga e della posizione dei presidi antincendio devono essere esposte in punti facilmente visibili.

Deve essere presente un impianto di rilevazione incendi collegato con una centralina di allarme. La rilevazione deve attivare segnali di allarme acustici e luminosi.

Devono essere presenti, disponibili e facilmente identificabili estintori in numero e tipologia adeguati sulla base delle risultanze della valutazione del rischio di incendio.

Tutte le verifiche, i controlli e le operazioni di manutenzione su sistemi, attrezzature (compresi eventuali dispositivi di protezione individuale-DPI) ed impianti antincendio, nonché l'attività di informazione e formazione antincendio dei lavoratori devono essere riportati su un apposito registro. Il registro dei controlli deve essere redatto per ottemperare alle prescrizioni di legge previste dalla normativa antincendio, DM 10/03/98 (art.4 e All.VI) e DPR n° 37/98 (art.5, punto 2). Il D.M. 10 Marzo 1998 prevede che l'attività

È fondamentale tener presente nel piano di emergenza delle specificità che presenta una struttura come lo stabulario e delle specifiche attività che vi si svolgono. Le procedure previste, comprese quelle relative all'evacuazione degli animali, devono essere a conoscenza di tutto il personale.

Fare attenzione a non utilizzare i corridoi come zona di deposito del materiale.

Ogni anno deve essere condotta una esercitazione con una prova di evacuazione.

I rilevatori ottici di fumo devono essere sottoposti a periodica verifica ogni 6/12 mesi o comunque ogni qualvolta se ne presenti l'esigenza.

Il controllo degli estintori deve essere effettuato semestralmente da una ditta autorizzata che provvede anche alla registrazione degli interventi eseguiti.

di sorveglianza possa essere effettuata da personale “*normalmente presente nelle aree protette*” purché abbia ricevuto “*adeguate istruzioni*” in merito. In questo caso, per attività di sorveglianza si intende esclusivamente il controllo visivo atto a verificare che le attrezzature e i sistemi antincendio siano nelle normali condizioni operative, facilmente visibili e non presentino danni materiali accertabili tramite esame visivo. Tutti i controlli che esulano da quello visivo devono essere effettuati da personale specializzato. Nel caso di interventi di operatori esterni alla struttura ed appartenenti ad una ditta qualificata è compito dell’incaricato interno alla struttura (per es. un addetto alla lotta antincendio o un preposto) verificare che i controlli siano effettuati con regolarità.

Tutte le possibili sorgenti di innesco devono essere attentamente valutate. In particolare è necessario considerare la possibile presenza di fiamme libere (becchi Bunsen), scintille e saldature per lavori di officina.

Nel caso esistano le condizioni per cui la legge preveda il Certificato Prevenzione Incendi – CPI (DPR 151/2011) è necessario provvedere alla richiesta di rilascio prima dell’inizio delle attività.

Le verifiche visive possono essere eseguite da un addetto alla squadra antincendio.

9 Rischi da Agenti Chimici

Indicazioni operative

I prodotti chimici presenti negli ambienti di lavoro possono determinare rischio per la salute o la sicurezza in seguito ad accadimento accidentale (cedimento, perdita, anomalia impiantistica, esplosione o incendio, reazione anomala o traboccamento) o in situazione di normale svolgimento dell'attività (evaporazione contatto, dispersione, abrasione, sintesi...). Ogni attività lavorativa in cui sono utilizzati agenti chimici pericolosi - produzione, manipolazione, immagazzinamento, trasporto o eliminazione - può comportare un'esposizione professionale con conseguenti rischi per la salute e la sicurezza.

In base al D.Lgs 81/08 e s.m.i., per agenti chimici pericolosi si intendono non solo le sostanze e i preparati (miscele o soluzioni costituite da due o più sostanze) identificati dal D.Lgs 52/97 e dal D.Lgs 65/03 ma anche quelli non classificati secondo questi D.Lgs (ad es. farmaci, cosmetici, fitofarmaci...) ma che possono comportare un rischio per la sicurezza e la salute per le loro proprietà fisico-chimiche, chimiche o tossicologiche e del modo di utilizzazione o presenza sul luogo di lavoro, compresi quelli a cui è stato assegnato un valore limite di esposizione professionale.

I Decreti Legislativi 52/97, 65/03 e le rispettive direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE sono state abrogati dal Regolamento CLP -*Classification, Labelling and Packaging* (Regolamento n. 1272/2008), a regime dal 1 giugno 2015.

Tale Regolamento, pur conservando alcune delle regole precedentemente in vigore, è basato sui criteri di classificazione ed etichettatura del GHS, cioè del sistema globale armonizzato nato sotto l'egida delle Nazioni Unite per cercare di superare le differenze esistenti tra i sistemi di classificazione in vigore nei vari Paesi. In base al CLP la dizione "preparato" è sostituita da "miscela" e quella di "categorie di pericolo" da "classi di pericolo". Queste ultime riguardano le proprietà fisico-chimiche (ne sono identificate 16), la salute umana (10), l'ambiente (1) e il potenziale danno allo strato di ozono (1). Le classi di pericolo non sono del tutto corrispondenti a quelle precedenti, con differenze più significative per le caratteristiche fisico-chimiche conseguentemente all'adozione di criteri attualmente in vigore a livello internazionale nel trasporto delle sostanze pericolose. La riclassificazione delle sostanze e delle miscele ha comportato una modifica nell'etichettatura con la sostituzione anche di molti pittogrammi. Un'ulteriore importante modifica riguarda le frasi di rischio e le frasi di sicurezza sostituite rispettivamente dalle indicazioni di pericolo H e dai consigli di prudenza P secondo criteri e con codici alfanumerici diversi.

Tutte le sostanze chimiche e le miscele considerate dal CLP devono essere accompagnate da una scheda di sicurezza, compilata a cura e sotto la responsabilità di chi la immette sul mercato (fabbricante, importatore, distributore). La scheda di sicurezza, SDS, (Regolamento UE n.453/2010), contiene le informazioni più importanti per un corretto uso e manipolazione delle sostanze chimiche oltre ai dati caratterizzanti il prodotto e le proprietà chimico-fisiche, tossicologiche, ecotossicologiche dello stesso. Essa deve obbligatoriamente essere trasmessa lungo tutta la catena di approvvigionamento ed aggiornata sulla base delle conoscenze tecniche e scientifiche più recenti qualora siano disponibili “nuove e rilevanti informazioni” che riguardano la sicurezza e la tutela della salute e dell’ambiente. Essa deve essere redatta in lingua italiana e deve riportare la data di compilazione. Sull’etichetta e nelle SDS devono comparire anche i pittogrammi, le indicazioni di pericolo H e i consigli di prudenza P. Le frasi H e P sono frasi convenzionali che descrivono rispettivamente i rischi per la salute umana, animale ed ambientale e i consigli di prudenza cui attenersi in caso di manipolazione di sostanze chimiche.

Negli stabulari possono essere impiegati numerose sostanze e miscele (tra cui anche farmaci) per la conduzione degli esperimenti. Un’altra fonte di esposizione può essere costituita dai detergenti, dai disinfettanti, dagli sterilizzanti e dalle altre sostanze utilizzati frequentemente e in quantità piuttosto rilevanti per la pulizia dei locali e delle gabbie e, più in generale, per far fronte alle esigenze di igiene.

Va ricordato che gli agenti chimici possono esercitare effetti tossici, cancerogeni, mutageni e sensibilizzanti prevalentemente per inalazione o per contatto essendo l’ingestione un evento da considerare esclusivamente accidentale. La tossicità è in genere correlata con la dose a cui si è esposti. In molti casi è quindi possibile identificare una dose soglia al di sotto della quale si ritiene che la maggior parte dei lavoratori possa rimanere esposta ripetutamente giorno dopo giorno senza effetti negativi per la salute (*Threshold Limit Value - TLV*).

Nel caso di azione sensibilizzante, invece, non è possibile determinare delle vere e proprie curve dose/risposta. La sensibilizzazione avviene prevalentemente per inalazione ma può essere conseguente anche a contatto con cute o mucose. Le manifestazioni più frequenti sono a carico dell’occhio (congiuntivite), della pelle (dermatite allergica) e dell’apparato respiratorio (rinite, asma).

Le caratteristiche fisico-chimiche della sostanza (stato fisico liquido, gassoso o solido; volatilità...) influiscono sulla possibile esposizione e la presenza contemporanea di più sostanze può comportare effetti sinergici generalmente di difficile valutazione. D’altra parte, è

I farmaci non rientrano nella classificazione europea delle sostanze e dei preparati pericolosi essendo regolamentati da norme diverse. Le informazioni sulla tossicità e sulle norme di comportamento, perciò, non sono desumibili dalla scheda di sicurezza (che nel caso dei farmaci non esiste) ma dalla documentazione autorizzata dagli enti di controllo disponibile anche via web nei siti delle aziende produttrici e delle autorità di controllo (AIFA: <http://www.agenziafarmaco.it/>; EMEA: <http://www.emea.europa.eu/home.htm>).

opportuno sottolineare che, abitualmente, nelle attività di ricerca sono utilizzate quantità molto piccole di sostanze chimiche (nell'ordine di grammi o decine di grammi) in modo non continuativo e per tempi brevi nell'arco della giornata lavorativa. Di conseguenza le esposizioni sono discontinue ed intermittenti o, addirittura, occasionali.

Rischi derivanti dall'utilizzazione di sostanze pericolose negli esperimenti

Analogamente ad altri laboratori, anche negli stabulari devono essere considerati i rischi legati all'utilizzazione di sostanze e preparati pericolosi nella conduzione di esperimenti. Gli sperimentatori devono conoscere le proprietà fisico-chimiche e tossiche delle sostanze utilizzate e le eventuali possibili interazioni nonché le misure di precauzione da adottare. Pertanto è essenziale consultare le schede di sicurezza delle varie sostanze e conservarne copia facilmente accessibile nel luogo dove sono utilizzate.

Gli operatori devono rispettare le procedure di sicurezza dei laboratori ed utilizzare i dispositivi di protezione individuale (guanti, mascherine, occhiali...) adeguati. Le manipolazioni devono avvenire sotto cappa chimica o utilizzando sistemi di aspirazione localizzata. Lo stoccaggio delle sostanze deve essere effettuato negli appositi armadi. I recipienti contenenti le quantità strettamente necessarie agli esperimenti in corso devono essere etichettati in modo da consentire la pronta riconoscibilità del contenuto. Lo smaltimento deve rispondere a quanto previsto per i rifiuti speciali. Le problematiche derivanti dall'impiego di agenti criogenici (ghiaccio secco, azoto liquido...) sono trattate nel cap.10 (rischi da agenti fisici, paragrafo sulle basse temperature).

Le misure da adottare nel caso di uso di gas anestetici sono indicate nel Cap.8 (Impianti e gestione delle emergenze, paragrafo Impianti)

È essenziale che i responsabili degli esperimenti verifichino che il personale coinvolto possieda le conoscenze e l'abilità necessarie ad operare e sia adeguatamente addestrato.

I principi a cui attenersi sono validi sia per le sostanze e i preparati classificati come pericolosi, sia per i farmaci.

Nel caso siano utilizzate sostanze cancerogene e/o mutagene (frasi di rischio R45; R46; R49 o, secondo il CLP, H340, H350), ad esempio nel caso di trattamento degli animali con agenti cancerogeni e con antitumorali, il datore di lavoro deve provvedere ad istituire e aggiornare un registro degli esposti, tenuto dal medico competente.

È importante definire procedure per la gestione di eventuali sversamenti di sostanze.

Rischi derivanti dall'utilizzazione di detergenti e disinfettanti

Le procedure di sanitizzazione comportano spesso l'impiego di detergenti, disinfettanti e sostanze ad azione scrostante. Esse devono garantire una corretta stabilizzazione e contribuire alla prevenzione dell'insorgenza di malattie infettive. Nel contempo, esse devono essere efficaci per la protezione degli operatori e permettere lo svolgimento delle attività abituali senza provocare danno o fastidi.

Va ricordato che il contatto diretto della cute con detergenti favorisce l'insorgenza di dermatiti irritative. Particolare attenzione va posta nell'uso di caustici (rischio di ustioni chimiche), di irritanti (che possono provocare infiammazioni dell'apparato respiratorio, della cute e delle congiuntive) e di sostanze sensibilizzanti (possibile insorgenza di reazioni allergiche locali e sistemiche), specie se volatili. L'uso di sistemi a circuito chiuso, come nel caso della sterilizzazione con soluzioni di acido peracetico o di gas plasma di perossido di idrogeno, evita la dispersione ambientale della sostanza tossica e la possibile esposizione degli operatori. Nel caso di utilizzazione di autoclavi ad ossido di etilene (EtO) il locale d'uso deve essere esclusivo, gli impianti di ventilazione devono essere sottoposti a verifiche costanti ed è necessario eseguire periodicamente indagini ambientali sulla concentrazione in ambiente di EtO. L'utilizzazione dell'Ossido di etilene è regolata dalla Circolare 56/ 83 del Ministero di Sanità che ne definisce le norme di impiego, i requisiti delle attrezzature, dei locali e del personale. L'accesso degli operatori nei locali dove sono stati praticati trattamenti con OEt o con formaldeide (ad es. per la sterilizzazione di locali e delle unità biohazard) dovrà avvenire solo dopo un congruo numero di ore necessario a far evaporare tutti i vapori residui dei gas.

Gli operatori devono seguire le indicazioni d'uso riportate sulle schede dei prodotti ed indossare i DPI necessari (guanti, occhiali protettivi,...).

La prolungata esposizione della cute in ambiente umido (come nelle attività di lavaggio o l'indossare guanti non traspiranti per lungo tempo con conseguente sudorazione eccessiva) facilita l'insorgenza di dermatiti irritative. Tra i disinfettanti i composti fenolici, i clorocomposti e lo iodio in soluzione acquosa o alcolica sono irritanti e corrosivi. La glutaraldeide e la formaldeide sono irritanti e sensibilizzanti.

La formaldeide, inoltre, è classificata come agente cancerogeno dalla UE e dalla IARC.

L'ossido di etilene oltre ad essere irritante è cancerogeno e mutageno. I limiti residui massimi accettabili di gas negli oggetti trattati sono stabiliti dalla Circolare n. 56/83 del Ministero della Salute.

10 Rischi da Agenti Fisici e da Sovraccarico dell'apparato Muscolo - Scheletrico

In questo paragrafo sono descritti i principali rischi da fenomeni meccanici con esiti traumatici, compresi quelli derivanti dall'utilizzazione di alcune attrezzature di lavoro di uso comune e da agenti fisici quali calore e rumore. I rischi derivanti dall'utilizzazione di radiazioni ionizzanti sono trattati in un capitolo dedicato.

È utile ricordare che, in tutti i casi in cui si verifichi un infortunio, il lavoratore deve informare immediatamente il datore di lavoro a cui consegnare la certificazione medica del pronto soccorso.

I datori di lavoro hanno **l'obbligo** di comunicare all'INAIL, **entro 48 ore** dalla ricezione dei riferimenti del certificato medico, i dati relativi agli infortuni che comportano un'assenza dal lavoro di **almeno un giorno**, escluso quello dell'evento (art. 3, co. 3-bis D.L. 244/2016 convertito con modificazioni dalla L. 19/2017). Tale comunicazione, da fare in via telematica all'INAIL, e per il suo tramite al sistema informativo nazionale per la prevenzione nei luoghi di lavoro (Sinp), ha esclusivamente fini statistici e informativi.

Nel caso in cui l'infortunio sul lavoro preveda un'assenza dal lavoro **superiore ai tre giorni**, il datore di lavoro ha l'obbligo della **denuncia** di infortunio ai sensi dell'art. 53 del DPR 30 giugno 1965, n. 1124, e s.m.i. In questi casi, l'inoltro della denuncia assolve contestualmente anche l'obbligo di comunicazione.

Rischi di caduta

Analogamente ad altri laboratori, anche per lo stabulario, devono essere considerati i rischi di traumi conseguenti a caduta per la presenza di superfici scivolose (ad es. per pulizie o sversamenti). È importante che la pavimentazione sia uniforme e non scivolosa, senza gradini e dislivelli pericolosi. Nel caso in cui vi siano scale fisse, i gradini devono avere pedate di dimensioni sufficienti per un buon appoggio. Le superfici devono essere mantenute asciutte. Inoltre, è necessario provvedere alla raccolta di eventuali sversamenti e alla segnalazione delle zone in cui si stanno facendo le pulizie rendendo interdetto il passaggio fino a quando il pavimento non sia asciutto. Particolare attenzione deve essere posta ai pavimenti dei locali di lavaggio.

Indicazioni operative

Non accatastare materiale lungo i corridoi per evitare che si possa inciampare.

Segnale di rischio di scivolamento e caduta.



Rischi di sovraccarico dell'apparato muscolo-scheletrico

Lo spostamento di oggetti pesanti (sacchi di mangime, box, castelli di gabbie...) può comportare un impegno eccessivo per l'apparato locomotore. Lo spostamento manuale degli oggetti può infatti determinare rischio di sovraccarico per l'apparato locomotore in funzione non solo del peso dell'oggetto ma anche dell'ampiezza dello spostamento, della sua angolazione, della postura da adottare, della comodità con cui può essere impugnato e della frequenza dei gesti. È quindi necessario valutare le condizioni operative in cui si svolge tale lavoro, specie se abituale e ripetuto, considerando la possibilità di eseguirlo con ausili quali carrelli. In tutti i casi, le manovre di spostamento devono essere eseguite senza scatti, avvicinando l'oggetto alla persona, non flettendo la schiena ed evitando torsioni del tronco. Lo spostamento manuale degli oggetti può determinare rischio di sovraccarico per l'apparato locomotore in funzione non solo del peso dell'oggetto ma anche dell'ampiezza dello spostamento, della sua angolazione, della postura da adottare, della comodità con cui può essere impugnato e della frequenza dei gesti. Deve essere posta attenzione anche al posizionamento dei contenitori sui ripiani e sulle scaffalature. In questo caso l'oggetto non deve essere mai sollevato oltre la propria altezza in quanto ciò potrebbe provocare un inarcamento eccessivo della schiena.

Gli operatori impegnati nelle attività sopra descritte devono essere adeguatamente formati circa l'utilizzazione degli ausili e la corretta esecuzione delle varie manovre di sollevamento/spostamento.

Rischio di ferite da taglio e punta

L'uso di taglienti e la necessità di manovre cruente (necroscopia, chirurgia sperimentale, prelievi e somministrazioni, collocamento di cateteri, drenaggi ecc.) possono comportare il rischio di lesione dell'apparato tegumentario e di traumi oculari. Tali infortuni sono dovuti all'impiego scorretto di strumenti chirurgici, siringhe, aghi, lame, seghe, strumentazione per necroscopie e per la tosatura del pelo. Gli errori che più frequentemente si verificano sono, ad esempio, quelli in cui la punta di aghi o taglienti viene indirizzata verso il corpo, oppure quando si raccolgono istintivamente strumenti che stanno cadendo, si rimuovono manualmente le lame dei bisturi dal portalama e gli aghi dalle siringhe.

È opportuno che il piano dei carrelli abbia angoli smussati per evitare ferite e sia dotato di dispositivo frenante.

Secondo la norma tecnica ISO 11228-1, cui fa riferimento il D.Lgs 81/08, il peso limite raccomandato non dovrebbe superare i 25 kg negli adulti. Tali limiti, in base ai criteri NIOSH integrati dalla norma tecnica UNI EN 1005-2 sono di 25 kg per gli uomini e 15 (20 secondo alcuni studiosi) per le donne. Per quest'ultime, peraltro, è ancora in vigore il limite di 20 kg stabilito dalla legge n.653 del 1934. Assicurarsi che le scaffalature siano di portata adeguata e fissate alle pareti per evitare il cedimento strutturale o il ribaltamento accidentale.

Attrezzature e strumenti taglienti inutilizzati devono essere collocati negli appositi armadi. Gli operatori devono essere informati sul loro corretto uso e sulle modalità di lavaggio. Non piegare, spezzare o manipolare in qualunque modo gli aghi. È opportuno che sia redatto e reso disponibile un manuale per il corretto uso degli strumenti taglienti.

Tutti gli strumenti devono possedere le caratteristiche di sicurezza previste dalla normativa, essere adeguati all'uso, essere regolarmente puliti e mantenuti in condizioni di efficienza. Particolarmente a rischio è la manipolazione delle carcasse degli animali: eventuali lesioni traumatiche possono costituire la porta di ingresso per la trasmissione di agenti biologici patogeni. Soprattutto per queste attività è importante utilizzare guanti antitaglio e dotarsi di occhiali di protezione. I guanti di protezione contro rischi meccanici devono rispondere alla norma EN 388. Questa normativa è applicabile a tutti i tipi di guanti da protezione per aggressioni fisiche e meccaniche causate da abrasioni, ferite da taglio, perforazioni e strappi. Le prestazioni dei guanti sono simbolizzate da pittogrammi seguiti da cifre che rappresentano gli indici di prestazione.

Aghi, siringhe, lame di bisturi e altri taglienti devono essere smaltiti negli appositi contenitori rigidi resistenti alla foratura evitando di riempirli fino all'orlo.

Rischi da alte e basse temperature

In relazioni ad attività specifiche devono essere considerate anche le lesioni da caldo (ustioni per uso di acqua a temperatura eccessivamente alta) o da freddo (congelamenti per manipolazione impropria e/o protratta di visceri congelati).

Il rischio di ustione può derivare da un'utilizzazione scorretta delle apparecchiature quali, ad esempio, becchi Bunsen, piastre riscaldanti, lavagabbie, autoclavi. Queste sono apparecchiature per la sterilizzazione che utilizzano vapore acqueo saturo a temperatura di 120-130°C in una camera a perfetta tenuta e resistente alla pressione. Le camere delle autoclavi possono avere capacità diverse. Il collaudo all'istallazione (I verifica), le successive verifiche periodiche e le eventuali esenzioni sono regolate dal D.M. 329/2004.

Le autoclavi sono utilizzate per sterilizzare:

1. materiale e strumenti da riutilizzare (pinze, vetreria, ecc.);



Questo pittogramma segnala i guanti di cui sono state provate e accertate le proprietà di resistenza ai rischi meccanici.

Esistono, inoltre, guanti di protezione contro tagli e ferite da coltelli a mano che rispondono alla norma EN 1082.



Controllare periodicamente e frequentemente l'efficienza delle guarnizioni delle autoclavi. Il valore massimo di pressione consentito deve essere chiaramente indicato sull'autoclave. Per l'applicazione del D.M. 329/2004 è molto utile far riferimento alle linee guida delle Regioni: (www.regioni.it/upload/gdfgdf.pdf) Assicurarsi periodicamente

2. materiale e liquidi per preparazioni sterili (biologia molecolare, colture cellulari, ecc.);
3. materiale per la stabulazione (gabbie, lettiere, mangimi, bottiglie, scaffali,...);
4. rifiuti infetti.

È indispensabile che gli operatori si attengano strettamente alle procedure di utilizzazione delle autoclavi per prevenire infortuni anche gravi dovuti all'esposizione a vapore bollente. Prima di aprire l'autoclave è necessario attendere che essa sia a temperatura ambiente: se esiste ancora pressione interna, aprire la valvola di scarico con molta cautela. Le operazioni di scarico devono sempre essere eseguite indossando guanti di protezione antiscottature.

Particolare attenzione deve essere posta in caso di procedure che comportino l'utilizzazione di azoto liquido. L'azoto ha un punto di ebollizione molto basso pari a 77,35 K (-195,82 °C). Per ridurlo allo stato liquido è necessario comprimerlo. In forma liquida può essere trasportato sotto pressione. Quando viene liberato assorbe grandi quantità di calore per poter evaporare. La pericolosità dell'azoto liquido dipende dalla sua bassissima temperatura. Infatti, quando l'azoto liquido bagna un corpo solido, può congelarlo molto rapidamente, rendendolo così estremamente rigido e di facile rottura. In caso di contatto con parti del corpo, si ha un congelamento rapidissimo con danni non reversibili e gravi. L'entità del danno aumenta con il prolungarsi della durata del contatto come può accadere nel caso in cui si bagnino gli indumenti.

Le operazioni che comportano l'utilizzazione di azoto liquido devono essere effettuate indossando apposite protezioni quali occhiali di sicurezza muniti di ripari laterali oppure una visiera; in casi particolari può essere necessario indossare una cuffia o un elmetto. Per la protezione delle mani è necessario utilizzare guanti per liquidi criogenici. I guanti devono calzare in maniera comoda in modo da poterli gettare via rapidamente nel caso penetrasse liquido al loro interno. Per proteggere il corpo indossare tute o camici preferibilmente privi di tasche. Evitare, inoltre, di portare orologi o gioielli. Utilizzare sempre scarpe chiuse facendo attenzione che l'orlo dei pantaloni poggi all'esterno di esse così da evitare che l'azoto, eventualmente sversato, penetri all'interno delle calzature.

dell'efficienza dei dispositivi automatici di scarico per eccessiva pressione (dischi di rottura e valvole di sicurezza).

Evitare di toccare con le mani (o con parti del corpo non protette) tubazioni o recipienti non isolati contenenti liquidi criogenici: la superficie estremamente fredda può incollarsi saldamente alla pelle che può lacerarsi nel tentativo di separazione dal metallo.

Il riempimento di un recipiente caldo o a temperatura ambiente con azoto liquido deve essere effettuato lentamente per ridurre le conseguenze dell'ebollizione ed evitare spruzzi di liquido. Non riempire i contenitori oltre il livello di sicurezza per evitare trabocchi durante il trasporto. Per il trasferimento dei contenitori utilizzare carrelli adeguati allo scopo.

Utilizzare pinze dalla presa sicura per immergere o estrarre oggetti dall'azoto liquido.

11 Rischi da Agenti Biologici

Indicazioni operative

L'esposizione ad agenti biologici è affrontata a livello normativo nel Titolo X del D.Lgs 81/08. Le norme in esso contenute si applicano a tutte quelle attività che possono comportare rischio di esposizione ad agenti biologici.

Nell'Art. 267 del D.Lgs 81/08 un agente biologico è definito come *“un qualsiasi microrganismo, anche se geneticamente modificato, coltura cellulare ed endoparassita umano, che potrebbe provocare infezioni, allergie o intossicazioni”* in lavoratori esposti, mentre un microrganismo è definito come *“una qualsiasi entità microbiologica, cellulare o meno, in grado di riprodursi o di trasferire materiale genetico”* e una coltura cellulare è definita come *“il risultato della crescita in vitro di cellule derivate da organismi pluricellulari”*.

Per rischio biologico si intende il rischio di contrarre una malattia determinata da un agente biologico capace di penetrare, moltiplicarsi e produrre effetti dannosi in un organismo vivente.

Tutti i lavoratori degli stabulari possono essere esposti in maniera più o meno continuativa ad agenti biologici. La sperimentazione animale implica, infatti, il contatto con vertebrati che possono essere trattati per ragioni scientifiche con agenti biologici. Inoltre, il contatto con gli animali può comportare un rischio dovuto alla trasmissione di malattie infettive dall'animale all'uomo (vedi cap. 11.4).

Le attività che possono comportare rischio di esposizione ad agenti biologici possono essere distinte in:

- attività con uso deliberato di agenti biologici;
- attività che, pur non comportando la deliberata intenzione di operare con agenti biologici, possono implicare il rischio di esposizione dei lavoratori agli stessi.

In uno stabulario rientrano nel primo gruppo quelle attività che comportano la manipolazione e/o l'inoculazione nell'animale da laboratorio di agenti biologici, per motivi diagnostici o di ricerca. Rientrano, invece, nel secondo gruppo, come indicato nell'allegato XLIV del D.Lgs 81/08, tutte le attività nelle quali il rischio può derivare dal contatto con gli animali e/o con prodotti di origine animale, con carcasse o con rifiuti speciali potenzialmente infetti.

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

- a) **agente biologico del gruppo 1:** un agente che presenta poche probabilità di causare malattie in soggetti umani (comprende tutti gli agenti biologici non presenti negli altri gruppi);
- b) **agente del gruppo 2:** un agente che può causare malattia in soggetti umani e costituire un rischio per i lavoratori. E' poco probabile che si propaghino nella comunità e sono disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche (ad es. *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani* e *botulinum*, *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae*, ecc);
- c) **agente biologico del gruppo 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* Hantaan, *Seoul virus*, *Sin Nombre*, ecc);
- d) **agente biologico del gruppo 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 (*virus Ebola*, *Lassa*, *Crimea-Congo*, ecc.).

La classificazione riguarda tutti gli agenti biologici esclusivamente in grado di provocare infezioni, allergie, intossicazioni nell'uomo. Nei casi in cui si utilizzino agenti biologici capaci di infettare solo gli animali devono essere adottate le misure di prevenzione e protezione generali.

La classificazione degli agenti biologici in gruppi da 1 a 4 è basata sulle informazioni disponibili che consentono di misurarne la loro pericolosità. Tale pericolosità è influenzata da molteplici fattori che comprendono:

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. Questa caratteristica varia a seconda del sottotipo o del ceppo dell'agente biologico;

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).

Come indicato nel D.Lgs 81/08, nel caso in cui l'agente biologico oggetto di classificazione non possa essere attribuito in modo inequivocabile a uno dei gruppi sopraindicati, esso va classificato nel gruppo di rischio più elevato.

Il Datore di Lavoro che intenda esercitare attività che comportino uso di agenti biologici dei gruppi 2 o 3 deve comunicarlo, almeno trenta giorni prima dell'inizio dei lavori, all'organo di vigilanza territorialmente competente (ASL).

Per l'utilizzo di un agente biologico del gruppo 4 è necessario, oltre alla comunicazione di cui sopra, ottenere l'autorizzazione del Ministero della Salute così come indicato nell'art.270 del D.Lgs 81/08 e s.m.i.

Il D.Lgs 81/08 e s.m.i. obbliga il Datore di Lavoro ad adottare, nei locali destinati ad animali da laboratorio deliberatamente trattati con agenti biologici dei gruppi 2, 3 o 4 a fini di ricerca, didattici o diagnostici, specifici livelli di contenimento per ognuno dei tre gruppi di rischio.

I livelli di contenimento definiscono i requisiti minimi da adottare per fornire un'adeguata protezione al personale che lavora con agenti biologici e per impedire la contaminazione dell'ambiente circostante.

Di seguito è riportata la tabella (Tab. 3) dell'allegato XLVII del D.Lgs 81/08 che riepiloga le misure di contenimento idonee per ogni gruppo di rischio.

La comunicazione deve contenere il nome, l'indirizzo dell'azienda (Istituto), il suo titolare (direttore) e il documento di cui all'art. 271, comma 5, del D.Lgs 81/08 e s.m.i.

Tabella 3. Allegato XLVII del D.Lgs 81/08

A. Misure di contenimento	B. Livelli di contenimento		
	2	3	4
1. La zona di lavoro deve essere separata da qualsiasi altra attività nello stesso edificio	No	Raccomandato	Si
2. L'aria immessa nella zona di lavoro e l'aria estratta devono essere filtrate attraverso un ultrafiltro (HEPA) o un filtro simile	No	SI, sull'aria estratta	Si, sull'aria immessa e su quella estratta
3. L'accesso deve essere limitato alle persone autorizzate	Raccomandato	Si	Si attraverso una camera di compensazione
4. La zona di lavoro deve essere chiusa a tenuta per consentire la disinfezione	No	Raccomandato	Si
5. Specifiche procedure di disinfezione	Si	Si	Si
6. La zona di lavoro deve essere mantenuta ad una pressione negativa rispetto a quella atmosferica	No	Raccomandato	Si

A. Misure di contenimento		B. Livelli di contenimento		
	2	3	4	
7. Controllo efficace dei vettori, ad esempio, roditori ed insetti	Raccomandato	Si	Si	
8. Superfici idrorepellenti e di facile pulitura	Si, per il banco di lavoro	Si, per il banco di lavoro e il pavimento	Si, per il banco di lavoro, l'arredo, i muri, il pavimento e il soffitto	
9. Superfici resistenti agli acidi, agli alcali, ai solventi, ai disinfettanti	Raccomandato	Si	Si	
10. Deposito sicuro per agenti biologici	Si	Si	Si, deposito sicuro	
11. Finestra d'ispezione o altro dispositivo che permetta di vederne gli occupanti	Raccomandato	Raccomandato	Si	
12. I laboratori devono contenere l'attrezzatura a loro necessaria	No	Raccomandato	Si	
13. I materiali infetti, compresi gli animali, devono essere manipolati in cabine di sicurezza, isolatori o altri adeguati contenitori	Ove opportuno	Si, quando l'infezione è veicolata dall'aria	Si	
14. Inceneritori per l'eliminazione delle carcasse degli animali	Raccomandato	Si (disponibile)	Si, sul posto	
15. Mezzi e procedure per il trattamento dei rifiuti	Si	Si	Si, con sterilizzazione	
16. Trattamento delle acque reflue	No	Facoltativo	Facoltativo	

I livelli di contenimento, che derivano dalla pericolosità degli agenti utilizzati, stabiliscono le caratteristiche strutturali dei locali in cui vengono trattati e mantenuti gli animali, le attrezzature che devono essere disponibili e le procedure operative ritenute necessarie per lavorare con agenti appartenenti ai vari gruppi di rischio.

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

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

E' necessario, comunque, attenersi alle misure generali di prevenzione

Si raccomanda anche, in caso di utilizzo o di potenziale esposizione ad agenti biologici, di applicare le indicazioni di buo-

e protezione previste in caso di esposizione ad agenti biologici, e rispettarle.

E' opportuno che i lavoratori dispongano dei servizi sanitari adeguati provvisti di docce con acqua calda e fredda (vedi cap. 2); nei casi in cui si ritenesse necessario, di lavaggi oculari e antisetici per la pelle. Nelle aree di lavoro in cui c'è rischio di esposizione è vietato assumere cibi e bevande, fumare, conservare cibi destinati al consumo umano e applicare cosmetici.

Tutti gli operatori devono rispettare le procedure di sicurezza ed utilizzare i dispositivi di protezione individuale (DPI) quali guanti, camici, occhiali, maschere filtranti ecc. adatti al tipo di rischio al quale sono esposti (vedi cap. 14).

I lavoratori devono, inoltre, essere informati sui rischi per la salute dovuti agli agenti biologici utilizzati, sulle misure igieniche da osservare e sul corretto impiego dei DPI. L'informazione e la formazione devono essere fornite prima che i lavoratori siano adibiti alle attività in questione, e ripetute, con frequenza almeno quinquennale, e comunque ogni qualvolta si verificano nelle lavorazioni cambiamenti che influiscono sulla natura e sul grado dei rischi.

I lavoratori esposti ad agenti biologici, qualora l'esito della valutazione del rischio ne rilevi la necessità, devono essere sottoposti a sorveglianza sanitaria (vedi cap. 15). Inoltre, i lavoratori addetti ad attività comportanti uso di agenti biologici del gruppo 3 e 4, in base all'art. 280 del D.Lgs 81/08, devono essere iscritti in un registro in cui sono riportati, per ciascuno di essi, l'attività svolta, l'agente utilizzato e gli eventuali casi di esposizione individuale. E' compito del Datore di Lavoro istituire ed aggiornare il registro e adempiere a tutti gli obblighi di legge inerenti.

111 Rischi da potenziale esposizione ad agenti biologici legati alla manipolazione e al trattamento degli animali

La manipolazione degli animali da laboratorio può comportare per gli operatori l'esposizione ad agenti biologici in conseguenza di morsi, punture durante i trattamenti o i prelievi ematici, punture durante le suture nelle operazioni chirurgiche. Possibili ferite, inoltre, possono essere causate dall'uso, durante le autopsie, di strumenti taglienti come forbici, bisturi, strumentazione per necroscopie e per la tosatura o dall'esposizione di frammenti di ossa.

ne prassi riportate nella letteratura internazionale e/o stabilite da appositi comitati di esperti nel settore.

Si ricorda, che il Datore di lavoro o un suo delegato, deve fornire a tutto il personale le procedure di sicurezza scritte. E' opportuno, inoltre, apporre nei luoghi di lavoro, in posizione ben visibile cartelli su cui sono riportate le indicazioni da seguire in caso d'infortunio o incidente.

Per i livelli di contenimento 2, 3 e 4 è obbligatorio esporre nei locali in cui si utilizzano tali agenti il seguente segnale di pericolo biologico:



Attrezzature e strumenti taglienti inutilizzati devono essere collocati negli appositi arma-

Gli errori che possono più frequentemente causare incidenti consistono nell'indirizzare la punta di aghi o taglienti verso il corpo, nel raccogliere istintivamente strumenti che stanno cadendo, nel piegare o rimuovere manualmente le lame dei bisturi dal portalama e gli aghi dalle siringhe.

Si ricorda che aghi, siringhe, lame di bisturi e altri taglienti devono essere smaltiti negli appositi contenitori rigidi resistenti alla foratura (vedi foto al lato) evitando di riempirli fino all'orlo.

Per prevenire morsi e abrasioni che si possono verificare durante la manipolazione e il contenimento degli animali è necessario che:

- L'operatore conosca il comportamento animale e sappia individuare eventuali segni di aggressività;
- Siano sempre utilizzate le tecniche di manipolazione standard corrette (specie specifiche);
- Il contatto diretto con gli animali sia limitato al minimo indispensabile;
- Siano adottati, quando compatibili con le manualità sperimentali, mezzi di contenimento.

Si può fare riferimento al capitolo sulle zoonosi (vedi cap. 11.4) per conoscere le infezioni che in caso di eventi traumatici possono essere trasmesse dall'animale all'uomo.

In tutte queste fasi è indispensabile per l'operatore l'uso degli adeguati DPI quali camici di protezione, guanti, occhiali e maschere di protezione adeguate (vedi cap. 14).

Nel caso di morsi o graffi, è opportuno lavare con acqua e sapone la parte interessata, disinfettare la ferita e rivolgersi quanto prima al Pronto Soccorso. Nel caso di lesioni con prognosi superiori ai tre giorni dovrà essere fatta la denuncia di infortunio per via telematica all'INAIL. I datori di lavoro hanno anche l'**obbligo** di comunicare all'INAIL, **entro 48 ore** dalla ricezione dei riferimenti del certificato medico, i dati relativi agli infortuni che comportano un'assenza dal lavoro di **almeno un giorno**, escluso quello dell'evento (vedi cap. 10).

11.2 Rischi da uso deliberato di agenti biologici negli animali da esperimento

Nella valutazione del rischio biologico, che deriva dalla possibile trasmissione di agenti patogeni (appartenenti ai gruppi 2, 3 e 4) dagli animali con essi trattati sperimentalmente, è indispensabile

di. Gli operatori devono essere informati sul loro corretto uso e sulle modalità di lavaggio.

Non piegare, spezzare o manipolare in qualunque modo gli aghi. Si ricorda che, in base alle normative vigenti, i contenitori devono essere smaltiti come rifiuti speciali



L'animale responsabile dell'infortunio e la gabbia dove è mantenuto devono essere isolati e segnalati al Responsabile dello stabulario che avviserà il Veterinario responsabile per i provvedimenti del caso.

analizzare nel dettaglio tutte le singole fasi operative che includono principalmente:

- 1) somministrazione dell'agente patogeno;
- 2) periodo infettivo;
- 3) prelievo dei campioni biologici;
- 4) autopsie e smaltimento carcasse.

Ogni singola voce costituisce una o più fonti di rischio per tutti gli operatori che a vario titolo si trovano a lavorare in uno stabulario. Di seguito sono prese in considerazione le singole fasi operative e messe in evidenza le principali fonti di rischio e le misure di prevenzione e protezione da adottare (Seamer and Wood 1981; 1999).

1) Somministrazione dell'agente patogeno

Si tratta di operazioni che espongono l'operatore a vari rischi e che devono essere eseguite da personale esperto e adeguatamente formato. Tutte le operazioni che comportano la manipolazione di materiale infetto devono essere effettuate sotto cappe di sicurezza adeguate al tipo di agente utilizzato.

Il metodo più comune per infettare gli animali è per via parenterale usando siringhe con ago. Per l'inoculo è consigliabile utilizzare siringhe monouso con ago fisso. La siringa deve essere riempita lentamente per minimizzare la formazione di bolle o di schiuma. Per evitare la formazione di aerosol, dovuto alla pratica comune di eliminare le bolle dalla siringa prima dell'iniezione, è importante espellere il liquido in eccesso e le bolle d'aria in un batuffolo di cotone inumidito con un disinfettante adatto.

E' importante, dopo l'uso, non ricoprire mai l'ago con il suo involucro di sicurezza ed eliminare la siringa in contenitori rigidi appositi (vedi foto al lato). Inoltre, è fondamentale prestare particolare attenzione alla formazione di aerosol che possono anche prodursi dagli sgocciolamenti o dalla rottura di siringhe e aghi, dall'urto della provetta contenente l'inoculo o durante il processo di rimozione del tappo da un contenitore. Nel corso di tutte queste fasi operative è sempre opportuno evitare di contaminare le superfici circostanti.

La somministrazione intranasale o per via orale richiede l'applicazione di misure di prevenzione e protezione ancora più rigide e una maggiore destrezza da parte dell'operatore. Gli aghi e le cannule devono essere smussati. Nel caso di somministrazione intranasale,

Le cappe di sicurezza rappresentano un valido sistema di prevenzione primaria collettiva in quanto impediscono la contaminazione dell'operatore e dell'ambiente di lavoro con aerosol e schizzi di materiale contenente agenti patogeni. Sono classificate secondo la norma europea EN 12469 in tre categorie in funzione del livello di protezione che garantiscono all'operatore, all'ambiente circostante e al prodotto. La scelta della cappa di sicurezza è determinata dal rischio associato agli agenti biologici utilizzati. Il disinfettante deve essere scelto in funzione dell'agente infettante, della matrice in cui esso è contenuto e delle procedure utilizzate.

in relazione all'agente biologico utilizzato, sarà necessario valutare l'uso di isolatori o gabbie ventilate in quanto l'animale deve essere considerato un potenziale rischio per la formazione di aerosol del microrganismo infettante durante gli atti respiratori.

In queste fasi, ed in funzione della pericolosità dell'agente trattato, è indispensabile per l'operatore l'uso degli adeguati DPI quali camici di protezione, guanti, occhiali e nel caso di inoculazione per via nasale o per aerosol, di maschere filtranti (vedi cap. 14).

2) Periodo infettivo

Il periodo infettivo coinvolge sia il personale impegnato nella pulizia degli animali che i ricercatori ed i tecnici impegnati nel prelievo di campioni dall'animale infetto. Nello stabulario la contaminazione degli operatori può avvenire tramite aerosol, ingestione, esposizione delle mucose - tra cui esposizione congiuntivale -, inoculazione parenterale di materiale infetto.

L'animale da laboratorio infettato con microrganismi patogeni diventa un serbatoio di infezione relativamente a quell'agente. Dopo un periodo di incubazione, gli animali possono eliminare l'agente infettivo in forma di essudato, pus o sangue da lesioni aperte, o in forma di goccioline prodotte da colpi di tosse, da starnuti, dalla normale respirazione. Molti agenti infettivi, inoltre, sono eliminati con le urine e con le feci e possono contaminare la lettiera, la pelliccia e la gabbia.

Il controllo delle vie di trasmissione è quello più facilmente attuabile nella prevenzione del rischio biologico.

E' opportuno alloggiare gli animali in isolatori in pressione negativa quando sono infettati per via respiratoria e, comunque, sempre quando vengono trattati intenzionalmente con agenti biologici del gruppo di rischio 3 e 4.

Relativamente alla trasmissione non direttamente veicolata dall'animale, particolare attenzione va prestata alla quotidiana pulizia delle gabbie in quanto si possono disperdere polveri dal sollevamento delle lettiere, creare aerosol dall'acqua contaminata sollevata durante il lavaggio delle gabbie o dal lavaggio delle bottiglie di abbeveramento. In caso poi di escrezione dell'agente patogeno attraverso urine e feci è importante prestare particolare attenzione allo svuotamento della lettiera. Le goccioline o gli schizzi prodotti, inoltre, possono anche causare infezioni direttamente o attraverso le mani. Schizzi diretti agli occhi permettono il passaggio di microrganismi per via congiuntivale. E' opportuno, quindi, che tutte queste operazioni vengano effettuate

I serbatoi d'infezione rappresentano l'ambiente in cui i microrganismi vivono e si moltiplicano, mantenendo o esaltando le loro caratteristiche di virulenza

sotto cappa di sicurezza adeguata alla classe dell'agente biologico utilizzato e che il lavaggio e la sterilizzazione delle attrezzature avvengano utilizzando apparecchiature automatiche. E' necessario, inoltre, decontaminare tutti i materiali di rifiuto e le lettiere prima dello smaltimento. In caso di animali trattati con agenti biologici del gruppo 4 è necessario che le lettiere vengano trattate in autoclave prima della rimozione dalla struttura.

E' necessario utilizzare gli opportuni DPI quali guanti, camici e occhiali protettivi, adeguati al tipo di rischio al quale si è esposti. Nel caso poi di diffusione del microrganismo per via aerea sarebbe opportuno che l'operatore indossasse maschere filtranti adeguate al tipo di agente infettante (vedi cap. 14).

3) Prelievo dei campioni biologici.

La raccolta dei campioni dagli animali comprende molti dei rischi precedentemente menzionati quali morsi, punture durante i prelievi ematici, tagli con il bisturi, punture durante le suture nelle biopsie o produzione di aerosol durante lavaggi polmonari, rettali, e vaginali. Nel caso di animali trattati deliberatamente con agenti biologici, oltre alle precauzioni già indicate è di fondamentale importanza prestare attenzione ai rischi dovuti all'esposizione dell'operatore all'aerosol prodotto dall'animale infetto.

E' opportuno, quindi, effettuare tutte le attività sotto cappa biologica adeguata al tipo di agente biologico utilizzato e prestare particolare attenzione alla scelta e all'uso corretto degli adeguati DPI (vedi cap. 14).

4) Autopsia ed eliminazione delle carcasse

La fase finale del procedimento sperimentale spesso prevede l'autopsia. In questo caso i rischi possono derivare dall'uso di strumenti taglienti come forbici, bisturi, strumentazione per necroscopie e per la tosatura o dalle ossa esposte. Le autopsie devono essere eseguite da tecnici qualificati e ben addestrati, l'animale deve essere ancorato su un tavolo autoptico lavabile e sterilizzabile e il pelo deve essere disinfettato utilizzando prodotti appropriati. Tutte queste operazioni devono essere effettuate sotto cappe di sicurezza adeguate all'agente biologico utilizzato.

Il rischio di aerosol può essere causato da schizzi di sangue, essudati o altri fluidi organici, o quando sono sezionati organi, in particolare i polmoni. Sarebbe opportuno conoscere il tempo di sopravvivenza dell'agente infettante sul pelo e nei vari organi interni. La manipolazione

di campioni potenzialmente infetti come sangue, organi e altri tessuti comporta dei pericoli ed è consigliabile effettuare queste operazioni sotto cappa biologica al fine di proteggere l'operatore. Il trasporto dei campioni deve essere effettuato utilizzando opportuni box di sicurezza. Anche in questa fase è fondamentale la scelta degli appropriati DPI in funzione del rischio e degli agenti infettanti. Soprattutto per queste attività è importante utilizzare guanti, antitaglio dove possibile, e dotarsi di occhiali di protezione. I guanti di protezione contro rischi meccanici devono rispondere alle norme EN 388 (vedi cap. 14). Alla fine dell'esperimento il piano di lavoro e le mani dell'operatore dovranno essere lavati e disinfettati accuratamente. Tutti gli strumenti, gabbie comprese, devono essere decontaminate prima del loro lavaggio. In caso di uso di agenti biologici del gruppo 4 tutte le lettiere degli animali devono essere trattate in autoclave prima della rimozione dall'istallazione. Tutto il materiale monouso utilizzato durante l'esperimento (garze, guanti, camici, maschere, ecc.) e le carcasse degli animali devono essere chiuse negli appositi contenitori ed incenerite.

11.3 Microorganismi geneticamente modificati (MOGM)

Un cenno all'uso di microrganismi geneticamente modificati (MOGM) viene riportato in questo manuale per fornire alcune indicazioni sulla normativa e sugli obblighi che essa impone per effettuare attività di ricerca sperimentale, compresa la sperimentazione preclinica e la terapia genica.

Per MOGM secondo il Decreto Legislativo 12 aprile 2001, n. 206, recepimento della Direttiva 98/81/CE, si intende *un microrganismo (entità microbiologica, cellulare e non cellulare, capace di replicarsi o trasferire materiale genetico, compresi virus, viroidi, cellule animali e vegetali in coltura) 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*.

L'utilizzazione di MOGM necessita di un'adeguata valutazione dei rischi dalla quale deve scaturire l'adozione delle necessarie ed idonee misure di sicurezza.

Negli ultimi due decenni si sono verificati rapidi e continui progressi nella tecnologia del DNA ricombinante. Tali mutamenti hanno portato

alla realizzazione, nei laboratori di ricerca, di grandi quantità di vettori artificiali utilizzati per il trasferimento genico tra specie differenti ed anche per la realizzazione di medicinali sperimentali per la terapia genica per il trattamento di alcune malattie nell'uomo.

Un'attenta valutazione del rischio è sempre necessaria quando vengono effettuati studi sull'animale trattato con acidi nucleici liberi (in genere inseriti in plasmidi), acidi nucleici complessati (plasmidi complessati con policoni, proteine, altri polimeri, incapsulati in liposomi o veicolati da particelle colloidali), vettori virali (derivati da *adenovirus*, *retrovirus*, virus adenoassociati, *lentivirus*, *herpesvirus*, virus vaccinico; di solito resi difettivi, ma in alcuni casi competenti per la replicazione *in vivo*), cellule geneticamente modificate (umane autologhe o allogene, xenogene, di origine microbica).

Gli adempimenti da seguire per una corretta valutazione del rischio biologico per l'impiego confinato di MOGM sono contenuti nel D.Lgs 206/2001. Di seguito vengono riportati in sintesi i principali adempimenti da seguire in caso di uso confinato, si rimanda al D.Lgs 206/2001 riportato in allegato per maggiori approfondimenti.

Sono esclusi dal campo di applicazione i microorganismi modificati con tecniche di mutagenesi tradizionale e MOGM ottenuti tramite auto clonazione (*self-cloning*), purché non patogeni per l'uomo, animali o piante.

Il D.L.vo 206/01 identifica l'Autorità competente con il Ministero della Salute.

Il legislatore prevede che l'utilizzatore proceda ad una valutazione dell'impiego confinato al fine di evitare i rischi per la salute umana e per l'ambiente che tale impiego potrebbe comportare. Tale valutazione, inoltre, deve tenere in particolare considerazione il problema dello smaltimento dei rifiuti e degli effluenti. Effettuata la valutazione l'utilizzatore assegna l'impiego confinato ad una delle quattro classi previste:

- 1) rischi nulli o trascurabili,
- 2) rischio basso,
- 3) rischio moderato,
- 4) rischio alto, applicando il relativo livello di contenimento (allegato IV).

E' bene tenere presente che a differenza del D.Lgs 81/08 in cui si classificano in quattro classi gli agenti biologici, qui l'oggetto della classificazione non sono i MOGM ma gli 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.

La normativa prevede, inoltre, per l'uso confinato una notifica d'impianto che deve essere inviata al Ministero della Salute dal titolare dell'impianto, e una notifica d'impiego (solo per le classi 2, 3 e 4), in impianti autorizzati, da inviare al Ministero della Salute da parte dell'utilizzatore, vistata dal titolare dell'impianto. E' importante ricordare che un impiego confinato della classe 3 o della classe 4 non può aver luogo senza l'autorizzazione scritta del Ministero della Salute. Inoltre, in merito alla richiesta di autorizzazione relativa agli impianti destinati ad impieghi confinati della classe 4, "la popolazione interessata deve essere messa in grado di esprimere il proprio parere in merito alla richiesta di autorizzazione relativa agli impianti destinati ad impieghi confinati della classe 4" (art. 11 comma 6 D.Lgs 206/2001).

Si ricorda che le notifiche di impianto e di impiego confinato di MOGM sono soggette a tariffa. In base al comma 4, Art. 11 del D.Lgs 206/01 sono irricevibili le notifiche prive della ricevuta del versamento della relativa tariffa stabilita dal DM Sanità del 2 maggio 2001, pubblicato sulla G.U. n.128 del 5 giugno 2001.

N.B. Le notifiche di impianto non hanno scadenza. Qualora si intenda apportare qualsiasi modifica all'impianto, il Titolare è tenuto ad informare immediatamente il Ministero della salute aggiornando le informazioni contenute nel modulo di notifica. Per Impieghi di classe I non è richiesta alcuna notifica se l'impiego avviene in un impianto già autorizzato.

Le notifiche di impiego hanno una durata di cinque anni, alla scadenza dell'autorizzazione tutte le attività relative all'impiego di MOGM devono essere interrotte; il notificante che intende proseguire nell'impiego ha l'obbligo di richiedere il rinnovo dell'autorizzazione, inoltrando via PEC (dgprev@postacert.sanita.it) la domanda entro i 6 mesi che precedono la data di scadenza.

11.4 Zoonosi

Per zoonosi, in base alla definizione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (O.M.S.), si devono intendere "tutte le malattie trasmissibili naturalmente dagli animali all'uomo e viceversa".

Le zoonosi rappresentano ancora oggi un pericolo sanitario sia per il personale impiegato nello stabulario che per coloro che lo utilizzano (tecnici e ricercatori).

Gli animali da laboratorio, comunemente usati nella ricerca biomedica, sono ospiti potenziali di un gran numero di agenti zoonosici e in questa sezione ci occuperemo in particolare delle principali zoonosi trasmesse dai ratti e dai topi all'uomo.

In uno stabulario i principali rischi di contaminazione biologica sono da imputare principalmente a morsi, graffi e abrasioni che si possono verificare durante la manipolazione e il contenimento degli animali e tramite i quali possono essere trasmessi agenti patogeni.

Tutti gli animali che entrano per la prima volta in uno stabulario devono sempre essere accompagnati da una certificazione sanitaria, che ne attesti lo stato di salute, rilasciata dal Veterinario dello Stabilimento di provenienza. Con la certificazione dovrebbe essere fornito anche un *report* sanitario indicante le analisi batteriche, virologiche e parassitologiche a cui sono stati sottoposti gli animali (vedi cap. 4).

Anche nei casi in cui gli animali siano certificati come sani, cioè privi di patogeni, è sempre opportuno adottare tutte le misure di sicurezza necessarie a minimizzare il rischio zoonosi, in quanto non si possono comunque escludere per gli animali ulteriori possibilità di contrarre infezioni. Infatti, colonie certificate sane in entrata e con elevata qualità microbiologica potrebbero venire a contatto con colonie di altri roditori (per esempio criceti o gerbilli), allevati con differenti standard di sicurezza, con colonie di animali allevati nello stesso stabulario non sottoposti a screening regolari, con roditori selvatici o artropodi presenti durante il trasporto o penetrati accidentalmente nello stabulario (Seamer and Wood 1981; 1999).

Negli ultimi anni, il miglioramento della progettazione e dell'organizzazione degli stabulari (vedi cap. 2), attraverso ad es. la presenza della quarantena e/o l'uso di isolatori o di scaffali ventilati, ha contribuito drasticamente alla riduzione del rischio zoonosi per gli operatori.

E'buona prassi, infatti, per tutti gli animali che entrano nello stabulario fare ricorso alla quarantena per un congruo periodo di acclimatazione e osservazione sanitaria. Inoltre, gli animali ritenuti non idonei devono essere isolati e sottoposti ai controlli clinici del caso.

Per minimizzare i rischi di contaminazione si consiglia di utilizzare animali provenienti da Stabilimenti Fornitori autorizzati e qualificati per le loro attività professionali (programma di sorveglianza sanitaria FELASA, certificazione ISO, AALAC, ecc.).

Il rischio di contaminazione biologica poi è ulteriormente abbattuto dall'uso corretto di dispositivi di protezione individuale (DPI) adeguati (vedi cap. 14) quali guanti, maschere, occhiali, camici ecc. E', comunque, sempre da evitare il contatto diretto e indiretto con materiali potenzialmente infettanti quali, ad esempio, secreti, escreti ed animali morti.

Tutto il personale che a vario titolo opera in uno stabulario, prima di entrare in contatto con gli animali, deve essere formato-informato sui rischi specifici. È, inoltre, necessario provvedere all'addestramento alla manipolazione corretta (procedure specie-specifiche) e alla cura degli animali in modo tale da non stressarli. In tal modo si riduce la possibilità di essere esposti a morsi, graffi, abrasioni o altri traumi. Le modalità e le figure che curano formazione e addestramento sono stabilite dal datore di lavoro, ai sensi del D.Lgs 81/08 e s.m.i..

Di norma, sulla base della valutazione dei rischi, i lavoratori con potenziale esposizione ad agenti biologici sono sottoposti a Sorveglianza Sanitaria (vedi cap. 15).

Il rischio di zoonosi è maggiore nelle persone con un sistema immunitario compromesso o in soggetti che si trovino in particolari condizioni fisiologiche come per esempio la gravidanza.

E' comunque compito del Medico Competente provvedere agli adeguati controlli e valutare lo stato di salute dei singoli lavoratori al fine di adottare, quando opportuno, gli interventi sanitari del caso. Nella Tabella 4 sono riportate le principali zoonosi e alcune informazioni sull'eziologia, sulla sintomatologia e sui test diagnostici nell'uomo (GV-SOLAS working group 1999; Hankenson *et al.* 2003; Newcomer and Fox 2007).

E' molto importante la vigilanza sull'uso corretto dei DPI assegnati, da parte del preposto

È importante che il preposto verifichi che il personale a contatto con gli animali applichi le procedure corrette che sono state oggetto di formazione ed operi con le abilità necessarie

Appena la lavoratrice comunica lo stato di gravidanza il Datore di Lavoro, sulla base delle indicazioni fornite dal Medico Competente e dall'RSPP, deciderà circa la permanenza o meno della lavoratrice nello stesso posto di lavoro.

Tabella 4.

Malattia	Agente	Via/modalità di Trasmissione	Periodo d'incubazione	Manifestazioni cliniche	Test Diagnostici
VIRUS					
Coriomeningite linfocitaria	<i>Lymphocytic Choriomeningitis virus</i> (LCMV)	Morso, orale, respiratoria, congiuntivale,	Da 8-13 a 15-21 giorni	Sintomi simili-influenzali, meningiti e meningoencefaliti raramente letali. Teratogeno nell'uomo	Diagnosi sierologica con Test Elisa
Malattia di Hantavirus					
1)Febbre emorragica con Sindrome renale (FESR o HFRS)	FESR: <i>Hantaan, Seoul virus, Dobrava, Puumala virus</i>	Respiratoria con inalazione di escreti, cutanea, digerente (ingestione), congiuntivale, morso	Da pochi giorni a mesi. In media da due a quattro settimane	HFRS:severità variabile (mortalità 5-15% con Hantaan virus). simili-influenzali con insorgenza febbrile brusca, emorragie e nefropatie. SPH: febbre, maldiage, disfunzioni gastrointestinali, distress respiratorio fulminante e morte. Tasso di letalità molto elevato (Circa 50%)	Diagnosi sierologica con Test Elisa, RT-PCR assay. L'eterogeneità del virus può complicare la diagnosi
2)Sindrome polmonare (SPH)	SPH: <i>Sin Nombre, Black Creek Canal, Bayou e New York-1</i>				
Encefalomiocardite	<i>Encephalomyocarditis virus</i>	Digerente e respiratoria	2-3 giorni	Sintomi simili-influenzali, encefaliti, miocarditi	Diagnosi sierologica con Test Elisa
BATTERI					
Febbre da morso di ratto					
1)Malattia di Haverhill	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	Morso, contatto con urine, secrezione e escreti infetti, alimentare	1-22 giorni; in media meno di 10 giorni	sintomi simili-influenzali, rash cutaneo con presenza di peccchie morbilliformi 75%, linfadeniti 25%, poliartriti in 40%	Culture cellulari da lesioni primarie, linfonodi, sangue o liquido sinoviale Test sierologici
2)Sotoku	<i>Spirillum minus</i> , spirocheta	Morso	da 2 settimane a 2 mesi	formazione ulcera molle nel punto della morsicatura con interessamento linfoghiandolare satelite, esantema maculopapuloso e febbre di tipo ricorrente	Lo spirillo non cresce in coltura ma deve essere inoculato nel peritoneo di topo o cavia da laboratorio
Leptospirosi	<i>Leptospira interrogans</i> circa 200 sierotipi patogeni tra cui i sierotipi <i>icterohaemorrhagiae canicola, pomona, ballum, ecc.</i>	Morso, contatto con urine, sangue e tessuto infetti. Inalazione di aerosol di gocce di urina	2 - 30 giorni	Sintomi simili-influenzali, anemia emolitica, emorragie diffuse di cute e mucose, coinvolgimento polmonare con epatica, grave ipotensione sanguigna e alta mortalità. Può provocare gravi infezioni renali ed epatiche, polmoniti e miocarditi. Forma fulminante nota anche come malattia di Weil.	Diagnosi sierologica con Test Elisa, isolamento di leptospire dal sangue tra i 7 e 10 giorni dall'infezione
Pasteurellosi	<i>Pasteurella multocida</i> ,	Morsi	Circa 2h	Ferite gonfie, arrossate e dolenti, linfangiti e linfadeniti con formazione locale di ascessi. In caso di diffusione sistemica sintomi simili-influenzali	Diagnosi sierologica con Test Elisa, RT-PCR assay
Pseudotubercolosi	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Digerente	3-7 giorni	diarrea acuta, enterocolite linfadenite mesenterica acuta	Isolamento microorganismo da escreti, secrezioni,tessuti, test di sierogglutinazione
Salmonellosi	<i>Salmonella enteritidis e Salmonella typhimurium</i>	Oro-fecale	Varia da 6h a 72h, in media da 12 a 36h	Da forme asintomatiche a forme settemiche, diarrea, gastroenteriti.	Coltura delle feci
MICETI					
Dermatofizie o tigna	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Contatto	1-2 settimane	Lesioni cutanee localizzate caratterizzate da aree iperemiche rotondeggianti con bordo talvolta rilevato e più o meno squamoso, spesso pruriginoso. Chiazze di alopecia	Esami microscopici e culturali, biopsie di aree cutanee sospette
PROTOZOI					
Toxoplasmosi	<i>Toxoplasma gondii</i>	Oro-fecale	5-20 giorni	Spesso asintomatica o con sintomi lievi con interessamento linfoghiandolare. Forme gravi in soggetti immunodepressi con meningoencefaliti, polmoniti, miocarditi	Dye-test (Sabin-Feldman), emogglutinazione indiretta, metodi immunoenzimatici, RT-PCR o Nested PCR
ELMINTI					
Imenolepiasi	<i>Hymenolepis nana</i>	Oro-fecale	variabile	1° anno asintomatico. Dolori addominali e diarrea, seguiti da astenia, calo di peso e cefalee	Ricerca di uova nelle feci
ARTROPODI					
Scabbia e malattie simili (Rogna sarcoptica)	<i>Sarcoptes scabiei, liponissoides sanguineus, Ornithonyssus bacoti</i>	Contatto diretto o indiretto, incluso contaminazioni di cibo, lettiera, contenitori e strumenti utilizzati nella cura degli animali.	immediato dopo l'esposizione all'artropode	Dermatiti, eczema, irritazione della pelle, lesioni da grattamento	Osservazione diretta o al microscopio di frammenti di pelle o di ciocche di capelli

12 Allergie

Le allergie professionali sono malattie che si sviluppano in ambito lavorativo causate da una ripetuta e consistente esposizione a sostanze (dette allergeni) presenti nei luoghi di lavoro in grado di provocare in soggetti predisposti un'anomala reazione del sistema immunitario. A differenza del rischio chimico non esiste un valore soglia al di sotto del quale si possa escludere la possibilità di tale effetto.

Gli allergeni presenti negli ambienti di lavoro sono molteplici e possono essere distinti in (Anzidei *et al.* 2003):

- 1) Allergeni di origine animale: acari, forfore, peli, escrementi, proteine salivari, urinarie e sieriche, ecc.;
- 2) Allergeni di origine vegetale: farine, fibre tessili, lattice, polline, ecc.;
- 3) Allergeni derivanti da funghi (muffe) e batteri: antibiotici, enzimi proteolitici, endotossine, ecc.;
- 4) Allergeni chimici: sostanze e miscele, farmaci, coloranti, detergenti, disinfettanti, ecc..

Le allergopatie di origine professionale sono difficilmente differenziabili da quelle comuni. Per parlare di malattia professionale è necessario che l'esposizione all'allergene avvenga nell'ambiente di lavoro, che venga diagnosticata la malattia e che venga stabilito il nesso causale tra lavoro e malattia stessa. Quest'ultimo andrà accertato attraverso un approfondito esame dell'ambiente di lavoro, del ciclo produttivo e della mansione svolta, allo scopo di individuare la presenza di sostanze allergizzanti nell'ambiente di lavoro, nonché attraverso l'analisi delle conoscenze sulla capacità biologica delle suddette sostanze di provocare la malattia osservata.

Tra le principali forme di allergie riscontrabili in coloro che, a vario titolo, sono a contatto con gli animali da laboratorio (personale addetto alla gestione delle colonie animali, veterinari, ricercatori, ecc.) e frequentano lo stabulario vi sono sia le allergie alle sostanze e miscele chimiche, al lattice dei guanti (vedi cap. 9), sia quelle dovute all'esposizione agli allergeni di origine animale. In particolare, una patologia occupazionale rilevante per il personale degli stabulari è la ben nota allergia da animali da laboratorio (LAA: *Laboratory Animal Allergy*). Numerosi studi riportati in letteratura nel corso degli anni hanno evidenziato che una percentuale tra l'11% ed il 44% dei lavoratori esposti continuativamente agli animali da laboratorio riportano sintomi allergici correlabili al lavoro (Seward 1999; Elliott

Indicazioni operative

al. 2005; Acton *et al.* 2007; Bush *et al.* 2003; Corradi *et al.* 2011; Caballero *et al.* 2012). Il *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH), il principale ente americano che si occupa di sicurezza e salute nei luoghi di lavoro, ritiene comunque ragionevole un range di prevalenza tra il 10 e il 30%.

Tra tutti coloro che hanno sviluppato sintomi, circa il 10% sviluppa nel tempo asma occupazionale. Uno studio italiano sulla LAA condotto tra i lavoratori di stabulario nelle Università di Trieste e Perugia riporta una prevalenza dell'allergia professionale agli animali da laboratorio di circa l'11% per entrambi i gruppi: più frequente la rinite (8,9% a Trieste e 7,5% a Perugia) rispetto all'asma (2,3% a Trieste e 3,7% a Perugia) (Larese Filon *et al.* 2002).

Gli allergeni presenti nell'ambiente di lavoro aderiscono alle particelle di polvere sospese in atmosfera e si depositano in breve tempo sulle superfici presenti e sul pavimento. Il personale si sensibilizza per inalazione, per contatto oppure a seguito di morsi e graffi. La sintomatologia clinica compare abitualmente in un intervallo di tempo che va dalle due settimane ai due o tre anni dall'esposizione. Le manifestazioni cliniche dell'allergia sono diverse, possono variare da soggetto a soggetto e possono consistere in: rash cutaneo (eczema, prurito, arrossamenti, orticaria), rinite (starnuti, secrezione e/o ostruzione nasale) o congiuntivite (secrezione oculare, fotofobia, gonfiore, arrossamento). Nelle forme più gravi si possono manifestare asma bronchiale (difficoltà respiratoria intensa) 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.

Le reazioni allergiche più comuni sono quelle nei confronti degli allergeni dei topi e dei ratti in quanto sono le specie più utilizzate nella sperimentazione animale. I principali allergeni sono stati identificati e caratterizzati (Tab. 5) e per la gran parte sono presenti nelle urine e appartengono ad una famiglia di glicoproteine extracellulari chiamate lipocaline (Bayard *et al.* 1996; Flower 1996; Robertson *et al.* 1996; Virtanen *et al.* 1999; Price and Longbottom 1990; Schumacher 1980; Siraganian and Sandberg 1979; Walls and Longbottom 1985).

Attualmente, grazie alle tecniche di biologia molecolare si conoscono le sequenze oligonucleotidiche dei principali allergeni di topo e ratto a cui sono esposti i lavoratori degli stabulari. Tali informazioni hanno consentito lo studio della LAA anche attraverso metodologie innovative, come la proteomica o *protein microarray* (Gonzalez-Buitrago *et al.* 2007; Harwanegg and Hiller 2006), che potrebbero risultare, integrate con metodologie più tradizionalmente utilizzate

in ambito occupazionale come il monitoraggio ambientale, un utile strumento per migliorare l'efficacia delle misure di prevenzione e protezione adottate (D'Ovidio *et al.* 2007; D'Ovidio *et al.* 2011; D'Ovidio *et al.* 2016).

Tabella 5. I principali allergeni delle specie più utilizzate nella sperimentazione animale

Animale	Allergene	MW _a (KD)	Sorgente	Funzione Biologica
Topo (<i>Mus musculus</i>)	Mus m1 (prealbumina)	19	pelo,forfora,urine	Lipocalin-odorant binding protein
	Mus m2 Albumina	16	pelo, forfora Siero	sconosciuta protein del siero
Ratto (<i>Rattus norvegicus</i>)	Rat n 1A/Rat n1B (a2u-globulin) Albumina	16-21	pelo,forfora,urine saliva Siero	Lipocalin-pheromonebinding protein Proteine del siero
Cavia (<i>Cavia porcellus</i>)	Cav p1 Cav p2		pelo, forfora,urine pelo, forfora,urine	sconosciuta
Coniglio (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Ory c1 Ory c2	17	pelo,forfora,saliva pelo,forfora,urine	sconosciuta
Modificata da: Wood R.(2001) ILAR J 42(1): 12-16				

La produzione di immunoglobuline E (IgE) da parte del soggetto esposto è il prerequisito per la manifestazione dei sintomi allergici nella maggior parte dei casi. La predisposizione a produrre IgE è geneticamente determinata e allergie preesistenti possono rappresentare un fattore di rischio ulteriore per lo sviluppo della LAA. Tuttavia, dati epidemiologici confermano che una costante, prolungata e consistente esposizione ad allergeni presenti nell'ambiente di lavoro rappresenta il fattore di rischio maggiore per lo sviluppo della LAA (Bush *et al.* 2003; Gordon *et al.* 2003).

Come allergia professionale, quindi, la LAA rappresenta un rilevante problema sia occupazionale che di assistenza sanitaria e la sua prevenzione dovrebbe essere uno dei maggiori obiettivi dei programmi di salute e sicurezza negli stabulari.

Prevenzione

Lo scopo della prevenzione è quello di ridurre il fenomeno dell'allergia e comunque di limitarne gli effetti.

E' noto che la riduzione dell'esposizione agli allergeni determina una riduzione dell'incidenza delle allergie; il primo intervento preventivo è quindi quello di ridurre il più possibile il contatto dei lavoratori con gli allergeni. Infatti, anche se è vero che la "predisposizione allergica" è geneticamente determinata per ciascun individuo, è anche vero che una riduzione dell'esposizione alla sostanza nell'ambiente di lavoro può far diminuire sensibilmente il numero dei lavoratori con sintomatologia clinicamente evidente.

Per gli allergeni non sono proponibili limiti di esposizioni da utilizzare come valori soglia, potrebbe però risultare utile effettuare un monitoraggio periodico degli allergeni presenti nei luoghi di lavoro per la valutazione dell'efficacia delle misure preventive adottate per la protezione dei lavoratori.

Sostanzialmente i metodi di prevenzione che possiamo adottare si distinguono in: misure tecniche, formazione-informazione e addestramento del personale, uso di mezzi di protezione individuale, sorveglianza sanitaria.

a) Misure tecniche di prevenzione

Da un punto di vista tecnico la riduzione dell'esposizione si può raggiungere tramite interventi sulle strutture degli stabulari quali sistema di areazione, gradiente di pressione, corridoio sporco-pulito, ecc.(vedi cap. 2).

La diminuzione della dispersione degli allergeni nell'ambiente di lavoro, ad esempio tramite il controllo delle polveri che si creano durante l'uso delle lettiere durante il cambio gabbia oppure il controllo di sostanze aerodisperse che si creano negli impianti di disinfezione non automatici, si può raggiungere con lavorazioni possibilmente a ciclo chiuso e automatizzando il più possibile i processi lavorativi.

Nel caso specifico della LAA è indicata l'applicazione di sistemi di aspirazione localizzata in tutte le aree lavorative a maggior rischio di esposizione agli allergeni, in particolare in quelle di arrivo animali e di lavaggio gabbie (ad es. uso di cappe aspiranti durante lo svuotamento delle lettiere esauste). Di notevole interesse sono, inoltre, i banconi aspiranti che possono essere utilizzati in tutte quelle occasioni in cui si verifica una maggiore produzione di polveri dovuta ad es. a manipolazione di animali per attività di ricerca. Una riduzione della dispersione degli allergeni si può ottenere, inoltre, contenendo l'affollamento degli animali nelle gabbie, usando lettiere a basso contenuto di polvere, utilizzando gabbie con coperchi filtranti, scaffali ventilati o isolatori.

Di fondamentale importanza nel controllo dell'esposizione risulta essere il monitoraggio ambientale (vedi cap.4.2).

b) Formazione - informazione e addestramento del lavoratore

L'informazione sul rischio allergologico ha lo scopo di creare una coscienza del rischio tra i lavoratori esposti. I lavoratori informati possono concorrere a prevenire, o almeno limitare, le conseguenze di sindromi allergiche. Tutti i lavoratori devono essere adeguatamente formati ed informati sui rischi specifici prima di essere autorizzati ad entrare in uno stabulario. Devono, inoltre, essere addestrati all'uso corretto dei mezzi di protezione personale (in particolare alle maschere filtranti), ad una corretta manipolazione dell'animale, ad una corretta procedura di vestizione (vedi cap. 14). Il datore di lavoro, cui competono tali obblighi ai sensi del D.Lgs 81/08 e s.m.i., deve, perciò, a tal fine, definire le modalità e identificare le figure dei formatori.

c) Uso dei Dispositivi di Protezione Individuale (DPI)

Anche nel caso della protezione dal rischio di allergie è di fondamentale importanza la scelta dei DPI quali maschere, guanti, tute impermeabili, ecc. (vedi cap. 14).

Particolare attenzione nel caso delle allergie va posta alla protezione delle vie aeree. Spesso i lavoratori addetti agli stabulari utilizzano per protezione le mascherine chirurgiche. Si ricorda che le mascherine chirurgiche sono state progettate esclusivamente per impedire la contaminazione dell'ambiente da parte dell'utilizzatore e non per proteggerlo dall'inalazione di sostanze nocive. A tale scopo, per alcuni lavoratori e per particolari mansioni e fasi lavorative a maggior rischio (arrivo animali, lavaggio gabbie, manipolazione animali) può essere utile l'adozione di maschere filtranti. Si tratta di respiratori progettati per aderire perfettamente al volto e prodotti con specifici materiali filtranti e assorbenti.

Si ricorda, inoltre, che l'impiego di maschere filtranti costituisce un valido intervento protettivo ma deve essere limitato nel tempo e per determinate fasi lavorative. E' comunque sempre compito del Medico Competente valutare l'adeguatezza ai rischi dei Dispositivi di Protezione Individuale e valutare, per ogni singolo lavoratore, la compatibilità dello stato di salute con il loro utilizzo.

d) La sorveglianza sanitaria

Nella prevenzione delle allergie i programmi di sorveglianza sanitaria giocano un ruolo fondamentale (vedi cap. 15).

E' molto importante la vigilanza da parte del preposto (vedi cap. 7) sull'uso corretto dei DPI assegnati.

Esistono sul mercato strumenti per valutare l'effettiva aderenza al volto dell'utilizzatore e la conseguente tenuta del respiratore.

Il Medico Competente (MC) indica le misure individuali e correttive finalizzate alla minimizzazione del rischio di sensibilizzazione agli allergeni in ambiente di lavoro, ponendo particolare attenzione alla presenza di soggetti atopici già in fase di accertamento preventivo.

Le visite periodiche, inoltre, dovrebbero consentire un precoce riconoscimento della sensibilizzazione attraverso i sintomi e le evidenze di laboratorio. In presenza di soggetti particolarmente suscettibili o con patologia conclamata il MC fornisce al Datore di Lavoro le necessarie prescrizioni al fine di predisporre particolari modalità di protezione per tali lavoratori. In casi estremi il MC darà indicazione per il cambio di mansione per evitare conseguenze più importanti.

E' utile ricordare che i lavoratori che manifestano sintomi clinici di sensibilizzazione possono richiedere la visita medica definita "*su richiesta del lavoratore*" ed espressamente prevista dal D.Lgs 81/08 e s.m.i..

Si parla di atopia per designare una predisposizione individuale, spesso ereditaria, alle malattie allergiche da ipersensibilità immediata con presenza di anticorpi circolanti IgE.

13 Rischi da Radiazioni Ionizzanti

Queste indicazioni riguardano la manipolazione ed eliminazione di animali ai quali siano stati somministrati radionuclidi. Si ricorda invece che animali che siano stati trattati con raggi X e raggi γ emessi da macchine radiogene NON costituiscono un rischio, e devono essere gestiti come normali animali da laboratorio.

Il rischio da radiazioni ionizzanti è regolamentato dal D.Lgs 230/95, che è strutturato nei principi e nella gestione operativa in modo molto simile al D.Lgs 81/08, di cui si è detto in altra parte di questo documento. E' opportuno ricordare in questo capitolo che per questo rischio viene individuata una figura professionale, denominata "Esperto Qualificato", sul quale ricade in particolare l'obbligo della esecuzione della "sorveglianza fisica". Tale attività si esplica nella effettuazione della valutazione dei rischi da radiazioni ionizzanti, nell'effettuare l'esame e la verifica delle attrezzature, dei dispositivi e degli strumenti di protezione, nell'effettuare la sorveglianza ambientale di radioprotezione nelle zone controllate e sorvegliate, nel procedere alla valutazione delle dosi e delle introduzioni di radionuclidi relativamente ai lavoratori classificati esposti, nell'assistere, nell'ambito delle proprie competenze, il datore di lavoro nell'individuazione e nell'adozione delle azioni da compiere in caso di incidente.

E' pertanto la figura principale alla quale fare riferimento per la maggior parte dei diversi problemi che possono presentarsi qualora le attività di stabulario prevedano l'utilizzo di animali ai quali siano somministrati radionuclidi.

In particolare, come accennato, l'EQ provvede alla classificazione degli ambienti di lavoro e dei lavoratori. A tale proposito si ricorda che le zone dove vengono utilizzate fonti di radiazioni (radionuclidi nel nostro caso, ma in generale qualunque sorgente di radiazioni ionizzanti) sono classificate, in base ai livelli potenziali di esposizione che possono determinarsi, in *zone controllate* (a maggiore potenziale esposizione) e *zone sorvegliate*. Tali aree devono essere segnalate e delimitate con appositi sistemi al fine, tra l'altro, di regolamentarne l'accesso e l'utilizzo.

Per quanto riguarda i lavoratori, l'EQ provvede, sulla base dei radionuclidi e delle procedure inerenti l'utilizzo, alla loro classificazione in *esposti di categoria A* (a maggiore potenziale esposizione), *esposti di categoria B* (a minore potenziale esposizione), oppure *non esposti*, qualora la stima del livello di potenziale esposizione non superi il limite stabilito per la popolazione generale, posta dalla legge ad 1 mSv. E' possibile pertanto, anche in caso di manipolazione di radionuclidi, che i lavoratori siano classificati non esposti.

Indicazioni operative

SIMBOLO RADIOATTIVITA'



Si ricorda infine che, in ottemperanza ai principi generali della sicurezza e salute nei luoghi di lavoro, il responsabile della esecuzione degli esperimenti deve accertarsi che tutto il personale coinvolto sia stato informato e formato (comprenda ed operi conseguentemente) sui rischi e sulle procedure operative necessarie per la minimizzazione degli stessi (manipolazione degli animali trattati, tecniche di pulizia e di eliminazione dei rifiuti). Le modalità di esecuzione delle procedure sono individuate dal DL all'interno delle attività di informazione e formazione del personale sui rischi lavorativi.

Tutto il personale classificato esposto deve inoltre essere sottoposto a sorveglianza medica, da parte di un medico di radioprotezione, ai fini della espressione del giudizio di idoneità, secondo i principi indicati nel capitolo 15. In assenza di un tale giudizio in corso di validità il personale non può essere adibito ad attività con esposizione a radiazioni ionizzanti.

Requisiti Documentali

Quando è necessario mantenere negli stabulari animali trattati con radionuclidi (isotopi radioattivi), istruzioni e procedure scritte vanno sottomesse all'autorità competente.

Una pratica che prevede l'uso di radiazioni ionizzanti è soggetta a regime comunicativo/autorizzativo. In casi di pratiche con determinate caratteristiche è necessaria l'autorizzazione da parte del Prefetto ("Nulla Osta di cat.B") in altre è sufficiente la cosiddetta "Comunicazione preventiva di pratica".

Nel caso di autorizzazione prefettizia, è necessario acquisire il CPI (Certificato Prevenzione Incendi) da parte dei Vigili del Fuoco (DPR 151/2011).

Le procedure specifiche sono contenute nella Relazione dell'Esperto Qualificato (E.Q.), documento di valutazione dei rischi da radiazioni ionizzanti obbligatorio ai sensi della normativa vigente (D.Lgs 230/95). Tale documento è allegato anche alle richieste autorizzative. Le informazioni necessarie alla redazione della "Relazione dell'E.Q." includono uno schema delle procedure, i dati riguardanti la specie ed il ceppo, il numero ed il peso medio degli animali da usare, il luogo dove avviene la somministrazione e la successiva stabulazione dell'animale trattato, il metodo di eliminazione delle carcasse, delle lettiere e dei rifiuti associati. Informazioni indispensabili comprendono il tipo di radioisotopo e la sua attività, nonché la dose che viene somministrata. Inoltre saranno specificate le procedure necessarie alla manipolazione ed allo smaltimento di materiale che potrebbe presentare un rischio chimico/biologico.

La valutazione della necessità del CPI spetta sempre all'E.Q.

Di norma, nell'ambito delle attività di informazione e formazione, tutte le procedure scritte sono consegnate ai lavoratori.

Si ricorda che anche nel protocollo sperimentale (vedi cap. 1) deve essere esplicitato l'utilizzo di radioisotopi e comunque di qualunque sorgente non sigillata o sigillata.

Procedure Operative

Le somministrazione ed applicazione di materiali radioattivi e tutte le procedure conseguenti (chirurgia, autopsia, etc) devono essere eseguite in aree di lavoro classificate e debitamente segnalate.

I materiali radioattivi volatili devono essere somministrati in cappe chimiche dedicate e dotate di adeguati sistemi di filtrazione, ed in ogni caso contenuti. Anche il successivo lavoro con gli animali trattati con tali materiali va eseguito sotto cappa.

Le gabbie che ospitano per più di otto ore animali trattati devono recare un'etichetta con il nome del radionuclide, l'attività somministrata per animale, la data di trattamento, il nome dell'utilizzatore autorizzato, ed un numero di telefono da contattare in caso di emergenza.

Talora non tutto l'ambiente stabulario/laboratorio può essere classificato come zona controllata o sorvegliata. E' infatti comune il riscontro di classificazione, ad esempio, del solo bancone dove viene regolarmente eseguita la pratica.

SIMBOLI ZONE
CLASSIFICATE



Se si conosce o solo si sospetta la possibilità che il materiale radioattivo somministrato possa essere eliminato attraverso le urine o le feci, la lettiera con le deiezioni deve essere raccolta e processata come rifiuto radioattivo.

I liquidi escreti, insieme a sangue ed altri fluidi biologici che rispondono ai criteri di solubilità per i rifiuti liquidi vanno eliminati negli appositi scarichi per radioattivi, in accordo con i limiti applicabili. Qualsiasi liquido non eliminabile in tale maniera deve essere assorbito prima dello smaltimento come rifiuto radioattivo.

Le carcasse ed i tessuti contenenti materiale radioattivo vanno manipolati ed eliminati come rifiuti radioattivi ad eccezione dei casi esplicitamente indicati con comunicazioni scritte dell'EQ.

Carcasse e tessuti dovrebbero essere sistemati in appositi contenitori previsti per i materiali radioattivi, contrassegnati da apposito simbolo ed identificati chiaramente come contenenti "animali" o "rifiuti biologici"

Le procedure per lo smaltimento delle carcasse richiedono in caso di utilizzo di radionuclidi con tempi di dimezzamento fisico prolungato, devono essere concordate con la ditta che provvede allo smaltimento. In

I contenitori in attesa di smaltimento devono essere congelati e portati nelle camere di contenimento dei rifiuti radioattivi secondo le procedure indicate dall'EQ,

Il materiale assorbente e gli altri rifiuti associati contenenti quantità significative di sangue ed altri prodotti che determinano odori sgradevoli dovrebbero essere separati e chiaramente identificati fino all'eliminazione come rifiuto radioattivo.

Tutte le gabbie usate per ospitare materiali radioattivi devono essere decontaminate secondo le procedure previste nella Relazione dell'EQ, prima del riuso da parte dello stabulario.

Anche in questo caso i lavoratori sono tenuti ad indossare i DPI (Dispositivi di Protezione Individuale) secondo le prescrizioni indicate dall'EQ, che è incaricato della scelta degli stessi in relazione ai radionuclidi impiegati ed alle procedure di lavoro previste.

Al fine di contenere i costi relativi allo smaltimento dei rifiuti speciali, ed in particolare di quelli radioattivi, è indispensabile mantenere al minimo i volumi previsti.

Pertanto:

- Quando possibile usare metodologie non radioattive e/o isotopi ad emivita fisica breve (<60 giorni);
- Quando sono usati ^{14}C e/o ^3H (ad emivita fisica misurabile in anni) le attività utilizzate andrebbero mantenute sotto 0.05 $\mu\text{Ci/g}$ di peso corporeo

Quando è dimostrato quantitativamente (attraverso una misura diretta) che il materiale radioattivo è concentrato in uno specifico distretto/organo che può essere successivamente rimosso, si può ottenere l'esenzione al fine di eliminare la carcassa come non radioattiva

questo caso, infatti, sarà necessario stoccare le carcasse ed i derivati presso istituzioni autorizzate. Nel caso invece di radionuclidi con tempi di dimezzamento fisico breve, sarà possibile, dopo un tempo (indicato dall'EQ) di stoccaggio controllato, smaltire le carcasse secondo i normali protocolli, poiché non più radioattive.

Le procedure di pulizia prevedono, di norma, una pulizia con detergenti leggeri. Sarà cura eliminare qualunque materiale (compresa l'acqua utilizzata) come rifiuto radioattivo, tenendo in considerazione i criteri già espressi per lo smaltimento delle carcasse

Sono ad emivita fisica breve il ^{32}P (14,3 giorni), lo ^{125}I (59 g). Sono ad emivita lunga o lunghissima il ^3H (12.4 anni) o il ^{14}C (5730 anni)

Tutte le deroghe a procedure standardizzate devono essere esplicitamente indicate dall'EQ

14 Dispositivi di Protezione Individuale

I Dispositivi di Protezione Individuale (DPI) sono presidi volti a proteggere il lavoratore da rischi propri degli ambienti di lavoro e delle attività che svolge. Devono essere impiegati quando i rischi non possono essere evitati o ridotti in maniera sufficiente da misure tecniche di prevenzione, da mezzi di protezione collettiva o da provvedimenti di riorganizzazione del lavoro (art. 75 D.Lgs 81/08).

Tutti i DPI devono essere conformi alle caratteristiche indicate nel D.Lgs 475/92 e s.m.i. e alle sue successive modificazioni. Questo decreto recepisce le direttive europee relative ai dispositivi di protezione individuale ed è finalizzato a rendere omogenee le legislazioni nazionali in merito. In base a questo decreto, i DPI sono classificati come appartenenti a tre categorie in funzione della loro capacità protettiva. La prima categoria riguarda la protezione da danni fisici di lieve entità. Alla terza categoria appartengono i DPI che proteggono da danni gravi e/o permanenti e dalla morte. La seconda categoria comprende quelli che non rientrano nelle altre due categorie. Tutti i DPI commercializzabili nella UE devono riportare la marcatura CE ottenibile secondo una specifica procedura di certificazione. Questa prevede che un apposito organismo di controllo autorizzato dal Ministero dell'Industria attesti la rispondenza del dispositivo a quanto indicato nel D.Lgs 475/92.

I DPI devono essere adeguati ai rischi da prevenire, alle condizioni esistenti nei luoghi di lavoro, rispondere alle esigenze ergonomiche e poter essere adattati all'utilizzatore secondo le necessità. Inoltre, devono interferire il meno possibile con lo svolgimento delle normali funzioni (ad esempio, le visiere devono limitare il meno possibile il campo visivo dell'operatore). In caso di necessità di uso simultaneo di diversi DPI, è necessario che essi siano fra loro compatibili e che mantengano le capacità protettive.

La scelta dei DPI ottimale, ovviamente, si basa sulla natura delle attività e dei rischi posti in essere. Nel caso degli stabulari, le parti che possono necessitare di protezione, in funzione delle attività svolte, sono soprattutto le mani, gli occhi e le vie respiratorie. I rischi più frequentemente riscontrabili negli ambienti (vedi cap. 7) sono quelli da esposizione ad agenti biologici e chimici. I dispositivi di comune utilizzazione negli stabulari sono i guanti, i camici, gli occhiali o le visiere. Per alcune operazioni o in alcune situazioni di particolare sensibilità del lavoratore è opportuno utilizzare anche sistemi di protezione delle vie aeree come maschere facciali filtranti.

Indicazioni operative

Art.4 del D. Lgs 475/92.

1. I DPI sono suddivisi in tre categorie.
2. Appartengono alla prima categoria, i DPI di progettazione semplice destinati a salvaguardare la persona da rischi di danni fisici di lieve entità. Nel progetto deve presupporre che la persona che usa il DPI abbia la possibilità di valutarne l'efficacia e di percepire, prima di riceverne pregiudizio, la progressiva verifica di effetti lesivi.
3. Rientrano esclusivamente nella prima categoria i DPI che hanno la funzione di salvaguardare da:
 - a) azioni lesive con effetti superficiali prodotte da strumenti meccanici;
 - b) azioni lesive di lieve entità e facilmente reversibili causate da prodotti per la pulizia;
 - c) rischi derivanti dal contatto o da urti con oggetti caldi, che non esponga ad una temperatura superiore ai 50°C;
 - d) ordinari fenomeni atmo-



Figura 11. Guanti per criogenici.

Guanti

Durante le operazioni di manipolazione degli animali, come ad esempio durante le medicazioni o i prelievi, la somministrazione di farmaci e il cambio della lettiera, è necessario utilizzare guanti monouso (Tab. 6). Sono abitualmente utilizzati guanti in lattice o vinile. I guanti 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.

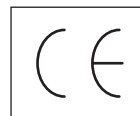
Sulla base della valutazione dei rischi sono individuate le attività lavorative, come ad esempio quelle che comportino una deliberata esposizione a microrganismi patogeni, per le quali è necessario l'utilizzazione di guanti conformi alla norma tecnica EN 374 e classificati DPI di III^a categoria. La norma EN 374 specifica i requisiti dei guanti destinati a proteggere l'utilizzatore contro prodotti chimici e/o microrganismi. Consta di tre parti: la EN 374-1 riguarda la resistenza chimica; la EN 374-2 la resistenza alla penetrazione; la EN 374-3 la resistenza alla permeazione.

Per le attività che comportano la manipolazione di contenitori di liquidi criogenici come l'azoto, è necessario utilizzare guanti specifici (norma tecnica di riferimento: EN 511 protezione dal freddo) (Fig. 11). Sulla base delle indicazioni del medico competente potranno essere adottati guanti particolari per soggetti con sensibilità specifiche (ad es. allergia al lattice).

- sferici nel corso di attività professionali;
- e) urti lievi e vibrazioni inidonei a raggiungere organi vitali ed a provocare lesioni a carattere permanente;
- f) azione lesiva dei raggi solari.

4. Appartengono alla seconda categoria i DPI che non rientrano nelle altre due categorie.

5. Appartengono alla terza categoria i DPI di progettazione complessa destinati a salvaguardare da rischi di morte o di lesioni gravi e di carattere permanente. Nel progetto deve presupporre che la persona che usa il DPI non abbia la possibilità di percepire tempestivamente la verifica istantanea di effetti lesivi.



Simbolo della marcatura CE

Evitare di toccare porte, maniglie, telefono, computer o altri oggetti indossando i guanti con cui sono state maneggiate sostanze chimiche o materiale biologico.

Evitare di portare le mani al viso mentre si lavora con gli animali.

Lavarsi frequentemente le mani in particolare quando si esce dallo stabulario.

Dispositivi per la protezione del corpo

Comprendono indumenti (camici copridivisa, copricapo, calzature/copriscarpe ecc.) conformi alla norma EN 14126. Questa stabilisce i requisiti prestazionali e i metodi di prova per gli indumenti di protezione contro gli "Agenti Infettivi". Possono essere di diversa tipologia (tuta, camice) in relazione alle modalità lavorative ed alle mansioni da espletare.

Per attività che non comportino la esposizione potenziale ad agenti biologici, come nel caso di visitatori o attività osservazionali senza manipolazioni dirette, è sufficiente utilizzare camici monouso a manica lunga con polsini, a chiusura posteriore.

Sistemi per la protezione del volto da schizzi di liquidi biologici e da altro materiale simile.

Si tratta di dispositivi quali occhiali di protezione, visiere o maschere di protezione o equivalenti. Sono DPI di II categoria. Devono essere conformi ai requisiti previsti dalla norma tecnica EN 166. Questa specifica i requisiti funzionali dei vari tipi di dispositivi per la protezione dell'occhio da gocce e spruzzi di liquidi. Il loro uso deve consentire l'uso di occhiali da vista eventualmente necessari all'utilizzatore. Devono essere resistenti al trattamento con disinfettanti.

Dispositivi di protezione delle vie respiratorie

Sono necessari per la protezione dall'inalazione in caso di manovre che comportino la produzione di aerosol o la dispersione di particelle (polveri, nebbie e fumi) provenienti da animali contaminati con germi patogeni. Offrono protezione anche dall'esposizione a particelle allergizzanti in individui sensibilizzati.

I facciali filtranti (Fig. 12) sono maschere a conchiglia dotate di particolari filtri. Sono DPI di III categoria. Per questo motivo, secondo quanto previsto dal D.Lgs 81/08 (art. 77, comma 5), è obbligatorio l'addestramento specifico del personale che li deve utilizzare. Questi deve saper indossare correttamente il facciale, assicurandosi che sia riuscito ad ottenere la tenuta dello stesso. Solitamente la corretta manovra di indossamento e la prova di tenuta sono illustrati nel foglietto illustrativo. Qualora la prova di tenuta dia ripetutamente esito negativo, è possibile eseguire una prova di conformità anatomica (Fit-Test) mediante metodi qualitativi o quantitativi. Nel caso il facciale sia poco adatto al volto dell'utilizzatore andrà sostituito con un altro con caratteristiche di indossabilità differenti.

I guanti contaminati da sostanze chimiche pericolose o liquidi biologici e deiezioni devono essere depositi nell'apposito contenitore.

Togliere sempre guanti, camice, copriscarpe e copricapo quando si esce dallo stabulario

Si ricorda che gli occhiali da vista e le lenti a contatto non sostituiscono l'utilizzo dei DPI per la protezione degli occhi.

EN 166: si applica a tutti i tipi di protettori individuali dell'occhio (non trattati in norme specifiche) utilizzati contro diversi pericoli che potrebbero danneggiare l'occhio o alterare la visione, ad eccezione delle radiazioni nucleari, dei raggi X, delle emissioni laser e delle irradiazioni infrarosse emesse da sorgenti a bassa temperatura.

Nella scelta del grado di filtrazione è opportuno tener presente che FFP è l'abbreviazione di *Filtering Facepiece Particle* e le sigle FFP1-2-3- indicano il grado crescente di protezione (efficienza filtrante dal 78% al 98%) di maschere e filtri.

FFP1 - protezione contro polveri e fumi (particelle solide) considerati molesti ma non immediatamente dannosi per la salute;

La scelta del grado di filtrazione (almeno FFP2) dipende dalla situazione in cui devono essere utilizzati. Nella scelta dei facciali filtranti è preferibile non eccedere nella classe di protezione per evitare un aumento troppo marcato della resistenza alla respirazione conseguente al maggiore strato filtrante. Esistono maschere che presentano, oltre alla versione semplice, una versione con valvola di espirazione. Questa favorisce l'espulsione dell'aria espirata con minore resistenza alla espirazione e riduce l'umidità residua all'interno della maschera con maggiore comfort e durata del DPI.

Devono essere conformi alla norma tecnica EN 149 - Norma Europea sui Respiratori per Polveri Senza Manutenzione.

Altri dispositivi quali maschere con filtro antipolvere o caschi/cappucci alimentati da elettroventilatore (ventilazione assistita) trovano scarsa applicazione nelle situazioni lavorative di nostro interesse.



Figura 12. Maschera FFP2.

FFP2 - protezione contro particelle dannose per la salute allo stato solido e liquido;

FFP3 - protezione contro particelle tossiche allo stato liquido e solido, contro particelle di sostanze cancerogene e radioattive, contro spore, batteri, virus ed enzimi.

Per praticità ed igiene sono consigliati i facciali filtranti pieghevoli e confezionati singolarmente.

Il Fit test (prova di conformità anatomica) serve a valutare l'adattamento della maschera al viso dell'utilizzatore e, quindi, l'effettiva protezione che, per motivi di conformità anatomica, può essere differente da quella nominale. Il test richiede che il soggetto su cui è eseguito sia addestrato al corretto indossamento ed utilizzo del facciale. La presenza di barba e baffi diminuisce l'efficacia dei facciali filtranti riducendo l'adesione al volto.



I facciali filtranti possono presentare perdita di tenuta nel tempo. È, perciò, opportuno sostituire i filtri dopo ogni turno di lavoro, o dopo tre turni per i modelli dotati di bordo di tenuta. Lo smaltimento dei filtri utilizzati con animali contaminati con agenti patogeni dovrà seguire le procedure previste per i rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo.

Verificare ad ogni turno la corretta tenuta del respiratore.


Tabella 6. Esempi di procedure di utilizzazione corretta dei DPI

Sequenza raccomandata per la vestizione completa in ambiente potenzialmente contaminato *	Rimozione in ambiente potenzialmente contaminato *
<ol style="list-style-type: none"> 1. soprascarpe o calzature specifiche 2. lavaggio mani 3. indossare camice monouso o sovracamice 4. facciale filtrante 5. occhiale o visiera 6. cuffia 7. lavaggio delle mani (con soluzione alcolica) 8. indossare i guanti coprendo il polsino del camice 	<ol style="list-style-type: none"> 1. togliere i guanti 2. lavaggio mani 3. rimozione cuffia e soprascarpe 4. lavaggio mani 5. camice monouso (piegarlo con all'interno la parte esterna) 6. lavaggio antisettico delle mani 7. occhiale o visiera evitando di toccare l'esterno 8. facciale filtrante (toccare solo le stringhe e non la superficie esterna) 9. lavaggio delle mani
<p><i>*(in analogia con le indicazioni dei servizi sanitari regionali e con le procedure ministeriali)</i></p>	

Sfilatura dei guanti

Prendere un lembo del guanto;
 rimuovere il guanto partendo dal polsino;
 sfilare il guanto quasi completamente, tenendolo nella mano rimasta guantata;
 inserire due dita sotto l'altro guanto e sfilare toccando sempre solo la parte interna e rovesciando il guanto per avvolgere il primo guanto rimosso.



15 Sorveglianza Sanitaria

Il D.Lgs 81/08 e s.m.i. prevede che i lavoratori per i quali dalla valutazione dei rischi sia emerso un rischio per la salute siano sottoposti ad un controllo sanitario. Tale controllo viene definito, insieme ad altre attività preventive di tipo medico, “sorveglianza sanitaria”. Tale attività viene svolta da un medico con titoli e preparazione specifica, che la legge ha definito “Medico Competente”. Le attività di sorveglianza sanitaria sono molteplici, ma quella maggiormente evidente ai lavoratori è l’effettuazione delle visite mediche finalizzate alla espressione del giudizio di idoneità. In concomitanza con l’inizio dell’attività lavorativa e successivamente con frequenza periodica, infatti, il lavoratore viene sottoposto, da parte del Medico Competente, ad un controllo sanitario.

Tale controllo ha la finalità di esprimere un giudizio che deve valutare la *“compatibilità tra lo stato di salute del lavoratore (con particolare riguardo ad organi ed apparati possibili bersaglio) ed il lavoro (mansione) svolto, in funzione dei rischi presenti”*.

Sono inoltre previsti dalla normativa controlli sanitari (accertamenti complementari, visita medica ed espressione del giudizio) anche in occasione di modificazioni della mansione lavorativa, nonché in caso di richiesta del lavoratore stesso.

Al termine dei controlli sanitari viene espresso un giudizio di idoneità alla mansione specifica, con una data di “scadenza”, entro la quale dovrà essere ripetuto il controllo e rinnovato il giudizio.

E’ opportuno ricordare che contro il giudizio di idoneità può essere inoltrato ricorso all’organo di vigilanza (ASL) sia dal lavoratore che dal Datore di Lavoro. In ogni caso il Datore di Lavoro deve tener conto delle indicazioni contenute nel giudizio di idoneità, in particolare per quanto attiene eventuali limitazioni alla attività lavorativa, e, in caso di inidoneità alla mansione specifica adibisce il lavoratore, *“ove possibile”*, ad altra mansione compatibile con il suo stato di salute.

Dal momento che l’attività lavorativa condotta in uno Stabulario comporta rischi specifici (imputabili, ad esempio, al contatto e alla manipolazione degli animali, all’impiego di agenti biologici e chimici, oppure allo svolgimento delle singole attività e procedure di lavoro), il Datore di Lavoro ha l’obbligo di far eseguire la sorveglianza sanitaria sui lavoratori esposti ad uno o più dei potenziali rischi indicati dalla Valutazione dei Rischi (vedi cap. 7). Nel D.Lgs 81/08 e s.m.i viene anche esplicitato l’obbligo del lavoratore (che prevede sanzioni per gli inadempienti) a sottoporsi al controllo sanitario suddetto.

Le visite mediche, effettuate a cura e spese del Datore di Lavoro, comprendono gli esami clinici e biologici e indagini diagnostiche, come

Indicazioni operative

Normalmente le visite del Medico Competente sono precedute dall’effettuazione di accertamenti clinici e/o strumentali (analisi del sangue, esami spirometrici ecc) necessari per l’espressione del giudizio di idoneità

Si valuta quindi la possibilità, ad esempio, di sviluppare aller-

detto mirati al rischio, ritenuti necessari dal Medico Competente. Il Medico, sulla base delle informazioni derivate dalla Valutazione dei rischi e da sue osservazioni personali, deciderà anche in relazione alla vaccinazione antitetanica e ad altre eventuali prassi vaccinali o provvedimenti di carattere sanitario.

Per tali motivi è necessaria la massima collaborazione da parte dei lavoratori per rendere efficaci tali strumenti preventivi. In particolare, oltre alla doverosa disponibilità all'esecuzione dei suddetti controlli sanitari, i lavoratori dovranno comunicare tempestivamente al Medico Competente importanti e pertinenti modificazioni del proprio stato di salute (ad esempio infezioni recidivanti, allergie subentranti) al fine di poter prendere, se necessario, gli opportuni provvedimenti. Tale modalità viene realizzata da parte del lavoratore attraverso la richiesta, di visita medica definita "*su richiesta del lavoratore*" ed espressamente prevista dal D.Lgs 81/08.

In caso di gravidanza, questa dovrà essere immediatamente comunicata dalla lavoratrice al Datore di Lavoro, che, sentito il Medico Competente, disporrà l'interdizione dallo Stabulario e adibirà la stessa ad attività non a rischio, concordate con il Medico Competente ed il Responsabile del Servizio Prevenzione e Protezione (RSPP).

Un aspetto importante della sorveglianza sanitaria è inoltre quello di valutare l'adeguatezza dei Dispositivi di Protezione Individuale (DPI) ai rischi e di valutare, per ogni singolo lavoratore, la compatibilità dello stato di salute al loro utilizzo. Deve essere valutata anche la necessità di eventuali protezioni aggiuntive da applicare al lavoratore che, per motivi di salute, risulti a maggior rischio rispetto ad un lavoratore sano.

Si ricorda che, in caso di giudizio di idoneità non più valido (cioè "scaduto") il Datore di Lavoro ha l'obbligo di interdire al lavoratore interessato l'accesso allo stabulario e le altre attività a rischio previste dalla mansione fino al rinnovo del giudizio stesso.

Oltre a quelle squisitamente sanitarie, il Medico Competente effettua una serie di altre attività che hanno lo scopo di fornire la propria collaborazione professionale al Datore di Lavoro per una corretta valutazione dei rischi. Attraverso le sue conoscenze nel settore della Medicina del Lavoro, nonché sulla base dei dati sanitari in suo possesso, infatti, il Medico Competente può fornire il proprio apporto, ad esempio, in termini di proposta e successiva valutazione di efficacia delle misure preventive adottate, ed in complesso a collaborare all'aggiornamento della valutazione dei rischi.

gie da animali da laboratorio e non il diabete, poiché non ci sono fattori di rischio che possano determinarlo

La vaccinazione antitetanica è obbligatoria per quelle categorie di lavoratori che hanno contatto con gli animali (pastori, allevatori di bestiame, stallieri) ai sensi della Legge n. 292/1963. Viene consigliata anche per gli addetti allo stabulario, sebbene l'agente causante il tetano sia un batterio anaerobio obbligato che popola le vie digerenti degli animali erbivori e viene eliminato con le feci, senza causare loro alcun danno.

Si ricorda, in relazione agli specifici rischi per la salute presenti nello stabulario, l'importanza delle notizie anamnestiche (cioè le notizie sul proprio stato di salute) che il lavoratore deve fornire al Medico Competente all'atto dei controlli sanitari periodici.

Parte Quarta

Aspetti Speciali

Parte Quarta

Aspetti Speciali

16 Organismi animali geneticamente modificati come modelli di malattia

Indicazioni operative

Si definisce Organismo Geneticamente Modificato (OGM) ogni organismo, animale o vegetale, il cui materiale genetico è stato modificato con tecniche di DNA ricombinante. Fanno parte degli OGM gli animali transgenici utilizzati nella sperimentazione scientifica.

Un animale è definito **transgenico** se nel suo genoma sono state inserite deliberatamente sequenze di DNA esogeno (**transgene**), cioè provenienti da altri organismi, quali altri animali, piante o batteri. In un animale transgenico il transgene è presente in tutte le cellule, inclusa la linea germinale, e quindi può essere trasmesso alla progenie. Gli animali transgenici sono anche definiti animali geneticamente modificati oppure ingegnerizzati.

Fra gli animali transgenici, il topo da laboratorio (*Mus musculus*) è il modello animale maggiormente 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. Sebbene l'uomo ed il topo, dal punto di vista evolutivo, si siano differenziati 75 milioni di anni fa, hanno mantenuto un notevole grado di somiglianza genetica e fisiologica come è risultato evidente dopo il completo sequenziamento nel 2001 del genoma umano (*International Human Genome Sequencing Consortium 2001*) e nel 2002 di quello murino (*Mouse Genome Sequencing Consortium 2002*). I topi transgenici sono pertanto utilizzati come modelli animali allo scopo di studiare patologie umane individuandone le cause ed i possibili interventi terapeutici. Fino ad oggi sono stati generati circa 20.000 ceppi mutanti di topo, geneticamente definiti e già disponibili per la ricerca, ed ogni anno se ne generano di nuovi.

Tecniche di Transgenesi

I topi transgenici possono essere generati utilizzando diverse metodologie che dipendono dall'obiettivo che si vuole raggiungere (Fig. 13).

Per l'inserimento *random* e/o *target* di uno o più transgeni nel genoma ospite si utilizzano tecniche quali:

- 1) Microiniezione di costrutti DNA esogeno nel pronucleo di oociti fecondati;
- 2) Transgenesi mediata da vettori virali;
- 3) Transfezione e microiniezione di cellule staminali in blastocisti;
- 4) Transgenesi mediante *Intracytoplasmatic Sperm Injection* (ICSI);
- 5) Transgenesi mediante l'impiego delle endonucleasi (ZFN, Talen, CRISPR-Cas9); (Gordon *et al.* 1980; Brinster *et al.* 1982; Palmiter *et al.* 1982; Kimura & Yanagimachi 1995; Perry *et al.* 1999; Gutierrez-Adan & Pintado 2000; Lois *et al.* 2002; Szczygiel *et al.* 2002; Li *et al.* 2003; Park 2007; Pfeifer & Hofmann 2009; Pfeifer *et al.* 2010).

Vengono di seguito analizzate in dettaglio le singole tecniche:

1) Microiniezione di costrutti di DNA esogeno nel pronucleo di oociti fecondati (zigote)

Questa è la tecnica comunemente adottata per produrre topi transgenici (Tg). In una femmina "donatrice" si stimola la superovulazione e la sincronizzazione dell'estro e viene successivamente accoppiata con un maschio fertile. Dopo la fecondazione la femmina viene sacrificata e si raccolgono gli oociti fertilizzati (zigoti) che si trovano negli ovidotti. A questo punto, prima che avvenga la fusione dei pronuclei e la divisione mitotica, si introduce il DNA esogeno nel pronucleo (in genere quello maschile), attraverso un sistema di microiniezione applicato ad un microscopio

Il transgene iniettato si integra in modo casuale nel DNA dello zigote, in un unico o in molteplici siti. Gli embrioni così ottenuti verranno poi trasferiti nell'ovidotto di una femmina pseudogravida, fatta cioè precedentemente accoppiare con un maschio sterile (ad es. vasectomizzato), simulando una fecondazione naturale. Alla fine della gravidanza nasceranno animali portatori del transgene in tutte le cellule, inclusa la linea germinale.

Questa metodologia utilizza costrutti di DNA di ridotte dimensioni (circa 10 - 20Kb).

Il DNA esogeno viene preferibilmente introdotto nel pronucleo maschile in quanto, essendo più grande di quello femminile, è di più facile manipolazione.

2) Transgenesi mediata da vettori virali

Questa tecnica prevede l'utilizzo di vettori virali per l'introduzione di sequenze di DNA esogeno di piccole dimensioni, in un embrione nelle prime fasi di sviluppo (solitamente allo stadio di 8 cellule). Mediante tecniche di DNA ricombinante, il transgene viene inserito nel vettore virale il quale, sfruttando la sua capacità di trasferire il proprio materiale genetico nelle cellule ospite, trasferisce anche il transgene. Tra i vettori virali più utilizzati in questo ambito ci sono i retrovirus, tra cui anche i lentivirus, i virus adenoassociati ed il virus dell'*Herpes simplex*. Questi virus, prima di essere utilizzati come vettori, vengono manipolati geneticamente in modo da inattivarli e renderli innocui sia per gli animali, sia per l'uomo (vedi cap. 11.3). L'embrione così ottenuto verrà poi trasferito nell'ovidotto di una femmina pseudogravida.

3) Microiniezione di cellule staminali (produzione di topi Target: knock-out e knock-in)

Questa tecnica prevede l'utilizzo di cellule staminali embrionali (*Embryonic Staminal-Cells*, ES). Le cellule staminali sono cellule totipotenti che possono, cioè, dare origine a cellule di diversi tessuti. A differenza delle metodiche precedenti, la microiniezione di cellule staminali permette di realizzare una mutagenesi mirata (*gene targeting*), cioè di inserire un costrutto di DNA esogeno in un sito predeterminato del genoma dell'ospite, normalmente attivato da un promotore tessuto-organo specifico. Le ES vengono prelevate da blastocisti di topo e mantenute in coltura fino al momento del loro reimpianto, in presenza di fattori che ne bloccano il differenziamento. In queste condizioni le ES mantengono comunque intatta la loro capacità di differenziarsi in qualunque tessuto. A questo punto nelle cellule ES viene introdotto il DNA esogeno (transfezione) mediante micromanipolatore applicato a un microscopio. Le ES vengono, quindi, reiniettate in blastocisti generalmente provenienti da topi di un ceppo diverso rispetto a quello del donatore delle ES. Le blastocisti vengono così impiantate in una femmina pseudogravida.

Questa tecnica può essere impiegata per scopi diversi. Se lo scopo è quello di inattivare un gene endogeno, la regione codificante di questo gene verrà interrotta mediante, ad esempio, l'inserzione di sequenze di DNA esogeno. In questo modo si ottiene la soppressione dell'espressione genica di uno degli alleli e si otterrà così un animale mutante che viene detto *knock-out* per lo specifico gene inattivato.

Se, invece, lo scopo è quello di sostituire l'attività di un gene con quella di un altro, si procederà ad una sostituzione mirata introducendo un

La transgenesi mediante vettori virali utilizza costrutti di DNA non superiori alle 8Kb.

Le ES venivano prelevate da topi caratterizzati da pelo di un colore diverso rispetto a quello dei topi che riceveranno le ES transfettate con il DNA esogeno. Ad esempio, ES prelevate da topi C57BL/6J (mantello nero) inserite in blastocisti di topi BALB/c (mantello bianco) determinerà una prole con percentuale variabile di animali con il mantello a macchie di colori diversi. Attualmente vengono utilizzate prevalentemente ES e blastocisti dello stesso ceppo omologo, a tutela del benessere degli animali.

DNA esogeno omologo codificante. In questo caso l'animale mutante che si ottiene viene detto *knock-in*.

Sia per i topi *knock-out* sia per quelli *knock-in* è possibile verificare l'avvenuta integrazione delle cellule staminali portatrici del trasgene anche dal punto di vista fenotipico. Infatti, il topo che si otterrà (chimera) è portatore di due popolazioni cellulari, le cellule della blastocisti originaria e le cellule ES portatrici del trasgene che determinano un fenotipo riconoscibile (cfr nota nella colonna delle applicazioni operative). Le chimere così ottenute verranno selezionate e fatte accoppiare con topi *Wild-Type* (WT) al fine ad ottenere progenie in cui le cellule staminali sono integrate nella linea germinale.

4) Transgenesi mediante *Intracytoplasmatic Sperm Injection* (ICSI)

Questa tecnica, particolarmente sofisticata, prevede l'adsorbimento del trasgene negli spermatozoi. Gli spermatozoi portatori del trasgene vengono successivamente iniettati in un oocita. L'embrione così ottenuto verrà poi trasferito nell'ovidotto di una femmina pseudogravida.

La transgenesi mediante ICSI utilizza costrutti di DNA di grandi dimensioni (circa 100-200 Kb).

5) Transgenesi mediante l'impiego delle endonucleasi (ZFN, Talen, CRISPR-Cas9)

Agli inizi del secondo millennio, i ricercatori hanno sviluppato i primi metodi di una nuova era per la transgenesi animale che, attraverso l'impiego di nucleasi (*Zinc Finger Nucleases*), anche sintetiche, permetteva loro di tagliare il DNA in punti specifici.

Più tardi, altre nucleasi sintetiche: *TALENs* (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) sono state studiate ed hanno fornito un modo più semplice per creare modelli target specifici. Dal 2013 è emersa una terza categoria: *CRISPR/Cas system* (*CRISPRs* (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*) che si sono rivelate molto più efficienti, largamente impiegate e con il vantaggio di poter modificare più geni contemporaneamente rispetto alle tecniche precedenti e perché non è necessario l'uso di cellule staminali ES ma la mutagenesi può essere effettuata nello zigote permettendone l'uso in altre specie oltre il topo. Questa tecnica è applicabile a tutte le specie inclusi i mammiferi superiori.

La modifica del genoma, con l'uso di endonucleasi ingegnerizzate è un tipo di ingegneria genetica in cui è inserito il DNA, sostituito o rimosso da un genoma utilizzando nucleasi costruite artificialmente, o "forbici molecolari". I sistemi CRISPR / CAS sono utilizzati da vari batteri e da archeobatteri per mediare la difesa contro i virus. Studi recenti hanno

dimostrato che di tipo II di CRISPR/ sistemi Cas può essere progettato per creare in vitro rotture mirate di sequenze specifiche nel doppio filamento del DNA, utilizzando un'unica "guida RNA", che è complementare al DNA (Jinek *et al.*, 2012). Questo sistema funziona in modo efficiente anche in cellule umane in coltura (Mali *et al.*, 2013; Cong *et al.*, 2013) e in vivo in zebrafish per indurre alterazioni mirate (Hwang *et al.*, 2015). In geni endogeni. Questi sistemi utilizzano la tecnica di inoculazione sia nel pronucleo sia nel citoplasma adottata per la transgenesi classica.

Tecniche di genotipizzazione degli animali transgenici

Indipendentemente dalla tecnica di trasgenesi utilizzata, al fine di verificare la presenza della mutazione indotta si procede alla genotipizzazione degli animali. Questa avviene tramite tecniche di biologia molecolare in cui si utilizzano frammenti di tessuto prelevato dagli animali da genotipizzare (apice della coda, lembo dell'orecchio, ecc.). Da questo tessuto verrà effettuata l'estrazione del DNA che verrà poi analizzato con tecniche che permetteranno di evidenziare la presenza o meno del transgene (PCR e *Southern blotting*) e/o la capacità di espressione del transgene stesso (RT-PCR, *Northern blotting*, *Western blotting* e immunofluorescenza).

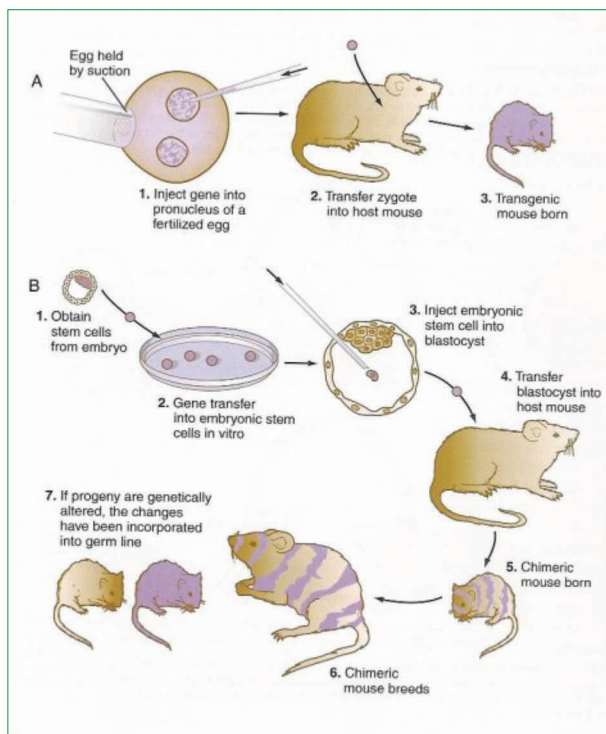


Figura 13. Tecniche di transgenesi

Produzione, archivi, analisi e reti distributive di modelli mutanti di topo.

Nel prossimo futuro si prevede che numerosissime mutazioni verranno prodotte attraverso l'uso delle cellule staminali e migliaia di topi mutanti saranno disponibili come modelli *in vivo* per lo studio delle malattie dell'uomo. Pertanto, diventerà essenziale avere a disposizione tecniche di archiviazione, di analisi e di elaborazione in rete di tutti i dati disponibili a questo riguardo. Sarà inoltre necessaria un'efficiente rete di sistemi distributivi dei diversi modelli mutanti di topo. A tal fine si stanno moltiplicando progetti internazionali in questo ambito, alcuni dei quali sono già disponibili e consultabili da parte della comunità scientifica, quali ad esempio il programma *Infrafrontier*, che comprende progetti quali, ad esempio, *Phenomefrontier* e *Archivefrontier*. Il primo si propone di realizzare una piattaforma europea che permetta l'accesso diretto all'analisi dei fenotipi dei topi mutanti mediante tecniche di *imaging*, informatiche, ecc., con particolare riferimento ai modelli per le malattie umane. Il secondo si propone di realizzare una piattaforma europea per l'archiviazione e la distribuzione, sia di modelli mutanti di topo ad altissima qualità sia di prodotti "intermedi" (es. cellule staminali, plasmidi, vettori, ecc.), e per l'accesso ai dati biologici sui ceppi disponibili, tramite la banca dati *dell'European Mouse Mutant Archive (EMMA resource database)*.

Aspetti gestionali e di sicurezza

La realizzazione, la stabulazione e l'allevamento di topi transgenici non comporta particolari differenze nella realizzazione, nella organizzazione e nella gestione degli stabulari e delle colonie animali ospitate. In particolare, anche animali portatori di importanti mutazioni, quali quelle che modificano la funzione immunitaria, possono essere stabulati all'interno di moderne strutture convenzionali. I livelli di sicurezza da applicare saranno quindi analoghi a quelli di una struttura convenzionale con analoghe funzioni. Relativamente all'impiego di MOGM per la realizzazione di animali transgenesi (lentivirus, adenovirus, ecc.) questo sarà gestito secondo i livelli di biosicurezza derivati dalla valutazione di cui al D.Lgs 206/2001 ampiamente illustrato nel capitolo relativo al Rischio biologico (vedi cap. 11.3).

Siti web di riferimento:

International knockout Mouset Consortium (IKMC):
<http://www.knockoutmouse.org>
<http://www.genome.gov>

Infrafrontier: <http://www.infrafrontier.eu/>

EMMA:
<http://www.emmanet.org>

KOMP: <http://www.komp.org/>

EUCOMM:
<http://www.eucomm.org/>

IMSR:
<http://www.findmice.org/>

IMPC:
<http://www.mousephenotype.org/>

EUMODIC:
<http://www.eumodic.org/>

17 I metodi alternativi alla sperimentazione *in vivo*

Indicazioni operative

La ricerca di tecniche alternative risponde sia all'esigenza di non impiegare più animali per fini sperimentali, in quanto ciò non è ancora scientificamente possibile, sia a limitarne il numero e a ridurne la loro eventuale sofferenza. Pertanto, il termine "alternativo" riguarda tutte quelle procedure che consentono di sostituire completamente l'uso di animali nella sperimentazione, ridurre il loro numero, o diminuire la quantità di dolore, di stress e di sofferenza dovuti a esigenze sperimentali.

La definizione di "metodo alternativo" prende origine dal testo di Russel & Burch del 1959 ed è comunemente conosciuta come il modello delle 3Rs: *Replacement*, *Reduction*, *Refinement*. Secondo gli autori qualsiasi tecnica definita come alternativa alla sperimentazione animale deve:

- sostituire (*replacement*), dove possibile, l'utilizzo degli animali da laboratorio con metodologie altrettanto efficaci;
- ridurre (*reduction*) il numero di animali usati per ogni singolo esperimento;
- raffinare (*refinement*) le procedure sperimentali per ridurre al minimo la sofferenza e lo stress causato agli animali impiegati.

Attualmente rientrano nel primo tipo (*replacement*) tutti i metodi che consentono di ottenere dati sperimentali senza ricorrere all'utilizzo degli animali. In particolare, si considerano "metodi sostitutivi biologici" quelli che utilizzano materiale biologico (batteri, colture cellulari, organi isolati, colture *in vitro*, tessuti ricostruiti) di origine sia animale che umana. Vengono inclusi tra i metodi sostitutivi biologici anche quelli che si avvalgono di animali non vertebrati, con esclusione dei cefalopodi. Vengono definiti "metodi sostitutivi non biologici" quelli che si avvalgono dell'utilizzo delle metodologie alternative teoriche quali la matematica, la bioinformatica, le reti neurali, la statistica, ecc.

Rientrano nella *reduction* tutti quei metodi che consentono di ottenere lo stesso livello d'informazione utilizzando un minor numero di animali, oppure di ottenere maggiori informazioni utilizzando lo stesso numero di animali.

Per poter applicare il concetto di *reduction* 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.

Rientrano, infine, nel *refinement* tutti quei metodi che consentono di alleviare sofferenze e danni dovuti alla sperimentazione. Oggi questo concetto è molto più ampio e complesso. Con il termine "raffinare" s'intende il porre attenzione a tutte le fasi che coinvolgono un animale prima, durante e dopo una procedura sperimentale e il considerare tutti quegli aspetti che riducono la sofferenza degli animali (anestesia, analgesia, ecc.) e che ne migliorano il benessere (arricchimento sociale e ambientale, ecc.). Buchanan-Smith e collaboratori (Buchanan-Smith *et al.* 2005) considerano il *refinement* qualsiasi metodo o approccio in grado di eliminare o alleviare l'effettivo o potenziale dolore, la sofferenza o qualsiasi condizione avversa in qualunque momento della vita dell'animale e/o che ne migliori le condizioni di benessere.

L'attenzione crescente ai metodi alternativi è stata recepita anche nella legislazione italiana e comunitaria. Il Decreto Legislativo 116/92, abrogato nel 2014, agli articoli 16 e 17 trattava dei metodi alternativi alla sperimentazione animale. Il 22 settembre del 2010 l'Unione Europea ha approvato la nuova Direttiva 2010/63/UE sulla sperimentazione animale recepita in Italia dal D.lgs. 26/2014 entrato in vigore il 29 marzo 2014. Tale direttiva promuove il ricorso ai metodi alternativi e modifica il sistema di concessione dell'autorizzazione da parte dell'autorità competente (vedi Cap. 1). In attesa del recepimento nella legislazione nazionale e in accordo con le indicazioni della Direttiva 2010/63/UE, il 20/04/2011 il Ministero della Salute ha già istituito il primo "Centro di Referenza Nazionale per i metodi alternativi, benessere e cura degli animali da laboratorio" presso l'Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia Romagna, con sede a Brescia.

La normativa italiana e quella europea sottolineano la necessità di utilizzare metodi alternativi ogniqualvolta ne esistano. La loro utilizzazione, però, richiede che essi siano stati preventivamente validati e approvati attraverso un preciso *iter*.

A livello europeo, allo scopo di coordinare la validazione dei metodi alternativi, è stato istituito l'*European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM), un'unità dell'Istituto per la Salute e la Protezione dei Consumatori (*Institute for Health and Consumer Protection*) di Ispra (Varese), che a sua volta fa parte del *Joint Research Centre* (JRC) della Commissione Europea.

L'ECVAM è stato istituito nel 1991, ha lo scopo principale di coordinare e finanziare studi di (pre)validazione di saggi *in vitro*, di favorire lo studio e lo scambio d'informazioni sullo sviluppo di metodi alternativi, di sviluppare e gestire una banca dati relativa a procedure alternative

e di promuovere il dialogo tra legislatori, industria, ricercatori, organizzazioni dei consumatori e organizzazioni animaliste. Per tutto ciò, l'ECVAM si avvale del supporto di un Comitato Scientifico, l'ESAC (ECVAM *Scientific Advisory Committee*). I metodi validati, dopo l'approvazione scientifica dell'ESAC, sono sottoposti a un *iter* di autorizzazione regolatoria per essere adottati a livello internazionale nelle linee guida dell'OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*, di cui OCSE è l'acronimo italiano) e/o fra i metodi di analisi ufficiali dell'Unione Europea.

Metodi alternativi disponibili e in corso di valutazione

Sono già disponibili diversi metodi alternativi validati (Tab. 7) e molti altri sono in fase di validazione (EURL ECVAM Status Report 2016). Il percorso di validazione di un metodo alternativo è un processo lungo, circa dieci anni, e complesso. Inizia con la definizione del metodo, la verifica dell'affidabilità (riproducibilità) e della pertinenza (capacità predittiva e applicabilità) per poi continuare con l'iter verso l'accettazione da parte delle autorità legislative.

La gran parte dei metodi alternativi **sostitutivi** dei test *in vivo* riguarda l'area sulla tossicità topica, che comprende irritazione/corrosione cutanea, fototossicità e assorbimento cutaneo e i test dei pirogeni. Tali metodi sono stati validati dall'ECVAM in seguito a studi condotti in collaborazione con diverse associazioni scientifiche e con gli enti corrispondenti di altri Paesi, tra cui quello statunitense, l'ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*).

Corrosione/irritazione cutanea. Per evidenziare i possibili effetti irritativi di alcune sostanze sulla cute sono oggi disponibili tre metodi alternativi sostitutivi di saggi *in vivo*. Si basano su modelli di pelle umana ricostituita (RhE) e sono: l'*Episkin*TM, lo *SkinEtic*TM, *EpiDerm*TM.

Nell'ambito specifico della corrosione oltre ai saggi menzionati sono disponibili altri tre saggi: il *Rat Skin* TER che misura la resistenza elettrica trans epiteliale di dischi di pelle di ratto, l'EST-1000 che si basa su modelli di pelle umana e il saggio *Corrositex* che misura il potenziale di corrosione limitato però ad acidi, basi e loro derivati. Tutti questi protocolli, a parte l'EST-1000 approvato dall'ESAC nel giugno 2009, sono presenti nell'allegato V della direttiva 67/548/CEE e nelle linee guida OCSE.

Indirizzo web dell'ECVAM:
<http://ecvam.jrc.it/index.htm>

Fototossicità. Si tratta di una reazione acuta causata dall'esposizione combinata ad una sostanza contemporaneamente a radiazioni visibili o ultraviolette. Tale reazione può manifestarsi anche in seguito al trattamento con sostanze di uso corrente come i cosmetici. Questo tipo d'effetto è evidenziato da un metodo *in vitro* (3T3 NRU PI), che utilizza la linea cellulare Balb/c 3T3, clone 31, presente nell'allegato V della direttiva 67/548/CEE e nelle linee OCSE.

Genotossicità/mutagenicità. La genotossicità indica la capacità di una sostanza di interagire con il DNA. Per mutagenicità, invece, si intende la capacità di provocare nel materiale genetico di cellule o organismi cambiamenti permanenti e trasmissibili. In questo ambito è in attesa di validazione il test *in vitro* del micronucleo di mammifero (micronucleus test). Il test utilizza cellule in coltura e serve a valutare cambiamenti nella struttura e nel numero dei cromosomi.

Assorbimento cutaneo. L'assorbimento cutaneo è quel processo mediante il quale una sostanza è trasportata dallo strato corneo attraverso l'epidermide e il derma, fino a raggiungere il sistema circolatorio e i diversi tessuti dell'organismo. Questa informazione è generalmente richiesta per accertare il possibile rischio legato a sostanze che possono venire a contatto con la pelle sia volontariamente, come cosmetici o farmaci, che accidentalmente come pesticidi e inquinanti ambientali. Il saggio *in vitro* attualmente disponibile, presente nell'allegato V della direttiva 67/548/CEE (metodo B45) e nella linea guida OCSE Tg 428, si basa fondamentalmente sulla misura della diffusione del composto in esame dalla superficie del campione di pelle, artificiale (metodo sostitutivo) o prelevata da animali (metodo di riduzione), ad un recipiente di raccolta, dove poi verrà opportunamente misurato.

Molti altri metodi alternativi già validati, o in corso di validazione, sono, invece, metodi di **riduzione e di raffinamento**, ovvero metodi che comportano la diminuzione del numero e della sofferenza degli animali per ogni singolo esperimento. Questi riguardano la sensibilizzazione cutanea, l'embriotossicità, la tossicità acuta orale, l'irritazione oculare, i saggi per l'attività di alcuni vaccini umani.

Irritazione oculare. Sono stati approvati dall'ESAC due test per saggiare l'irritazione oculare su materiali *ex vivo*: il BCOP (*Bovine Corneal Opacity and Permeability*) e l'ICE (*Isolated Chicken Eye*), presenti nelle linee guida dell'OCSE. Entrambi i test utilizzano parti di scarto di animali provenienti dai macelli. Sono stati sottoposti a ECVAM, e sono in attesa di validazione, due saggi di sostituzione che utilizzano

tessuti umani ricostituiti (RhT), lo *Skin EthicTM Human Corneal Epithelium* (HCE) e l'*EpiOcularTM OCL-200* e un sistema in vitro, l'*Ocular Irritection assay. Sensibilizzazione cutanea*. Non esistono ancora metodi alternativi sostitutivi, ma sono validati solo metodi *in vivo* di *reduction/refinement*, utilizzati per evidenziare i possibili effetti sensibilizzanti di una sostanza. Tali metodi sono descritti nell'allegato V della direttiva 67/548/CEE (B6) e nella linea guida OCSE 406 e utilizzano la cavia. L'ESAC ha convalidato nel 2007 il Test *Reduced Local Lymph Node Assay* (rLLNA). Tale test utilizza il topo e rappresenta una versione ridotta del *Test Local Lymph Node assay* (LLNA) validato 20 anni fa. L'rLLNA è un test di riduzione e di raffinamento che permette di diminuire sia il numero che la sofferenza degli animali, ma che non fornendo informazioni sulla potenza, non può essere considerato come un sostituto del LLNA tradizionale. Attualmente tre metodi alternativi *in vitro* sono in fase di pre-validazione: il *Direct peptide Reactivity Assay*, il *Myeloid U937 Skin Sensitisation Test* (MUSST) e lo *Human Cell Line Activation Test* (hCLAT). Tali metodi utilizzano colture di cellule dendritiche di origine umana.

Embriotossicità. Anche in questo settore sono stati sviluppati e validati (ECVAM) dei metodi che consentono di individuare possibili effetti nocivi sull'embrione. Uno di questi è il saggio di sostituzione (*Embryonic Stem Cell test*, Est), che si basa sull'uso di cellule staminali, validato anche da OCSE. Altri due sono saggi di riduzione (*Micromass e Whole Embryo*), non sono ancora entrati nell'allegato V della direttiva europea e nelle linee guida OCSE.

Tossicità acuta orale. I saggi di tossicità acuta sono richiesti per evidenziare possibili effetti indesiderati provocati da una singola dose di sostanza/prodotto e utilizzano roditori. Recentemente, per la tossicità acuta orale sono entrati nelle linee guida OCSE tre metodi (*Fixed Dose Procedure*: Tg 420, *Acute Toxic Class*: Tg 423, e *Up-and-down method*: Tg 425), che riducono il numero di animali fino all'80 per cento rispetto al precedente protocollo (Tg 401).

I Non-Testing Methods sono altri metodi in fase di sviluppo che prevedono approcci teorici basati sul presupposto che le proprietà PBT (persistenza, bioaccumulabilità e tossicità) delle sostanze possono essere predette in base alla loro struttura molecolare o derivate dalle proprietà di composti simili ad attività nota. I modelli di elezione in questo ambito sono quelli denominati (Q)SARs (*Quantitative*) *Structure Activity Relationships* ovvero relazione quantitativa struttura - attività).

L'applicazione dei metodi alternativi già esistenti e lo sviluppo di nuovi metodi dovrebbe permettere di arginare il possibile aumento dell'utilizzo degli animali dovuti all'entrata in vigore del REACH. Il regolamento REACH (CE) - n. 1907/2006 del Parlamento Europeo e del Consiglio Europeo - è entrato in vigore il 1° giugno 2007, sostituisce buona parte della legislazione comunitaria attualmente in vigore in materia di sostanze chimiche e introduce un sistema integrato per la loro registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione. Molte sostanze e miscele dovranno essere sottoposte a nuovi esami sulla loro pericolosità. In mancanza di dati disponibili, vi è l'obbligo di eseguire test sperimentali per caratterizzare le loro proprietà fisico-chimiche, tossicologiche e ambientali. Ciò comporterà costi molto alti (Abbott 2005; Goldberg and Hartung 2006) sia in termini economici che di animali da laboratorio (vertebrati) sacrificati nei prossimi 10 anni malgrado il richiamo, in più punti del Regolamento, all'uso dei metodi alternativi alla sperimentazione animale. Il REACH, infatti, sottolinea in maniera incisiva, in accordo con la direttiva 86/609/CEE, la necessità di sostituire, ridurre o migliorare le sperimentazioni su animali vertebrati e di fare ricorso a metodi di prova alternativi, tra cui metodologie assistite da computer, appropriati test *in vitro* ed esami basati sulla tossicogenomica. Alla fine del 2005, sulla base di queste nuove esigenze legislative, l'ECVAM è stato incaricato di sviluppare una strategia di test per l'applicazione del REACH. Da allora notevoli progressi sono stati ottenuti per i test di tossicità riguardo sia la drastica riduzione del numero di animali utilizzati sia la validazione su larga scala di test di cito-tossicità *in vitro*. Più complicata si presenta, invece, la sostituzione dei test di embriotossicità, di tossicologia riproduttiva e di cancerogenicità su animali con altri *in vitro*. Infatti, i complessi meccanismi alla base di questi *endpoints* non consentono la sostituzione del test su animale con un singolo test *in vitro*.

Un notevole impulso allo sviluppo di nuovi metodi alternativi a livello europeo è venuto dal Regolamento sui prodotti cosmetici (CE) n. 1223/2009 del Parlamento Europeo e del Consiglio (approvato il 30 novembre 2009 e pubblicato sulla gazzetta ufficiale dell'Unione Europea del 22/12/2009) che sostituisce la direttiva cosmetici 76/768/CEE. Il Regolamento presta particolare attenzione alla sicurezza dei cosmetici e alle responsabilità di produttori e controllori. Inoltre, pone limitazioni all'uso di sostanze cancerogene e introduce nuove disposizioni sul ricorso sicuro ai nanomateriali, sulla rintracciabilità e sull'etichettature dei cosmetici. In continuità con le precedenti disposizioni (in particolare con la precedente direttiva 2003/15/CE, nota come VII modifica alla direttiva 76/768/CEE sui cosmetici) nel

Per approfondimenti sul REACH consultare il link dell'Agenzia europea delle sostanze chimiche (ECHA): echa.europa.eu/home_it.asp

Regolamento viene confermato il divieto di immissione sul mercato di prodotti oggetto di sperimentazione sugli animali o contenenti ingredienti testati su animali in tutti i casi in cui siano disponibili metodi alternativi validati e accettati nella legislazione internazionale. Il divieto di commercializzazione esiste dal 2009 con l'eccezione dei test di tossicità a dosi ripetute, tossicità riproduttiva e tossico-cinetica per i quali è entrato in vigore nel 2013.

Tabella 7. Metodi alternativi validati

Tipo di test	Metodi validati	Situazione al 2009
Irritazione cutanea	<i>Episkin™, SkinEtic™, EpiDerm™</i> : TG 431	<i>Replacement</i>
Corrosione cutanea	<i>Episkin™, SkinEtic™, EpiDerm™</i> : TG 431 e <i>EST-1000; Rat TER</i> : TG 430. <i>Corrositex</i> :TG 435	<i>Replacement</i>
Irritazione oculare	<i>Bovine corneal Opacity and Permeability (BCOP)</i> : TG 437; <i>Isolated Chicken Eye (ICE)</i> : TG 438; Saggi di <i>Replacement</i> sono stati sottoposti ad ECVAM per la validazione	<i>Reduction</i>
Sensibilizzazione cutanea	rLLNA: TG 429, <i>non radioactive LLNA protocol</i> : TG 442A/B	<i>Reduction/Refinement</i>
Tossicità acuta orale	<i>Fixed Dose Procedure</i> : Tg 420; <i>Acute Toxic Class</i> : Tg 423 and <i>Up-and-down method</i> : Tg 425	<i>Reduction/Refinement</i> <i>Reduction</i>
Assorbimento cutaneo	<i>In vitro diffusion method for mesuring skin absorption</i> :Tg 428	<i>Replacement</i>
Fototossicità	3T3 NRU PI: TG 432	<i>Replacement</i>
Genotossicità/ Mutagenicità	<i>In vitro micronucleus test</i> : TG 487	<i>Reduction</i>

Tipo di test	Metodi validati	Situazione al 2009
Embriotossicità	<i>Embryonic Stem Cell test, Whole Embryo, Micromass</i>	<i>Reduction</i>
Saggi per vaccini umani	Saggio ELISA per attività vaccino del tetano Saggio ToBI per attività vaccino del tetano Saggio ELISA per attività vaccino dell'erisipela	<i>Reduction</i>
Test dei pirogeni	<i>Human whole Blood IL-1 e HL-6, PBMC IL-6, MM6 IL-6, Human Cryopreserved Whole Blood IL-1</i>	<i>Replacement</i>

Modificato da "ECVAM Status Report on the Development, Validation and Regulatory Acceptance of Alternative Methods and Approaches (2016)" and "ESAC statements on alternative methods"

Bibliografia e Riferimenti normativi

- Abbott A. Animal testing: more than a cosmetic change. *Nature*. 438, 144-146 (2005)
- Acton D., McCauley L. Laboratory animal allergy: an occupational hazard. *AAOHN J* 55, 241-244 (2007)
- AIRESPA: Manuale di biosicurezza nei laboratori, edizione italiana. Terza edizione. In: Supplemento di Prevenzione Oggi, numero 2. (2005)
- Anzidei P., Frusteri L., Giovinazzo R., Todaro N., Venanzetti F. Allergia al Lavoro? I principali allergeni presenti nei luoghi di lavoro. INAIL ISBN 88-7484-010-1 (2003)
- AVMA Guidelines on Euthanasia. Schaumburg IL: American Veterinary Medical Association. (2007)
- Ballardini D., Bonfanti M., Fanton C., Macor A, Regione Piemonte – ASL 3. Procedure operative per la gestione del paziente a rischio SARS, (2004)
- Balls M., Goldberg A.M., Fentem J.H., Broadhead C.L., Burch R.L., Festing M.F., Frazier J.M., Hendriksen C.F., Jennings M., van der Kamp M.D., Morton D.B., Rowan A.N., Russell C., Russell W.M., Spielmann H., Stephens M.L., Stokes W.S., Straughan D.W., Yager J.D., Zurlo J., van Zutphen B.F. The three Rs: the way forward: the report and recommendations of ECVAM Workshop II. *Altern Lab Anim.* 23, 838-866 (1995)
- Bayard C., Holmquist L., Vesterberg O. Purification and identification of allergenic alpha 2 μ -globulin species of rat urine. *Biochem Biophys Acta.* 1291, 253-255 (1996)
- Booth N.H. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Iowa State Pr; 6th edition. ISBN-10: 0813817390 (1988)
- Brecht R.H.U & Kirkwood J.. The UFAW Handbook on the care and management of laboratory and other research animals. VIII Edition. Wiley-Blackwell, New York. 848 p. (2010)
- Brinster R.L, Chen H.Y, Warren R, Sarthy A, Palmiter. Regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion plasmids injected into mouse eggs. *Nature* 296, 39-42 (1982)
- Buchanan-Smith H.M., Rennie A.E., Vitale A., Prescott M.J., Morton D.B. Harmonising the Definition of Refinement. *Animal Welfare.* 14, 379-384 (2005)
- Bush R.K., Stave GM. Laboratory animal allergy: an update. *ILAR J.* 44, 28-51(2003)
- Caballero M.L, Ordaz E., Bermejo M., Rodriguez-Perez R., Alday E., Maqueda J., Moneo I. Characterization of occupational sensitization by multiallergen immunoblotting in workers exposed to laboratory animals. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 108, 178-181 (2012)
- Carroll GL. Ames IA. Small Animal Anesthesia and Analgesia. Blackwell Publishing. (2008)

Circolare del Ministero della Sanità del 22 giugno 1983 n. 56 - Impiego del gas tossico Ossido di Etilene.

Circolari applicative del Ministero della Sanità n. 6 del 2001 Applicazione del decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 116, in materia di protezioni degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. (GU n. 144 del 23-6-2001)

Circolari applicative del Ministero della Sanità n. 8 del 1994 Applicazione del decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 116, in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. (G.U. Serie Generale n. 163 del 14 luglio 1994)

Commissione Consultiva Permanente per la Salute e la Sicurezza sul Lavoro. Prime indicazioni esplicative in merito alle implicazioni del Regolamento (CE) n. 1907/2006, del Regolamento (CE) n. 1272/2008 e del Regolamento (UE) n. 453/2010 nell'ambito della normativa vigente in materia di salute e sicurezza nei luoghi di lavoro. (<http://www.lavoro.gov.it/Lavoro/SicurezzaLavoro>)

Compton S.R., Homberger F.R., MacArthur Clark J. Microbiological monitoring in individually ventilated cages systems. *Lab Anim (NY)* 33, 36–41 (2004)

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas System. *Science*. Feb 15;339(6121):819-23 (2013)

Conferenza dei Presidenti delle Regioni e delle Province Autonome. ISPESL. Metodologie e interventi tecnici per la riduzione del rumore negli ambienti di lavoro. Manuale di buona pratica. Revisione dell'ottobre 2009. (http://www.ispesl.it/Linee_guida/tecniche/ManBPRumore/indexMBP.htm)

Coordinamento tecnico per la prevenzione degli assessorati alla sanità delle Regioni e Province autonome di Trento e Bolzano. Linee guida per l'applicazione del D. Lgs 626/94: Documento n.12: Uso dei dispositivi di protezione individuale, 1998.

Coordinamento tecnico per la sicurezza nei luoghi di lavoro delle Regioni e delle Province autonome. Linee guida per l'applicazione del D. Lgs 626/94: Protezione da agenti cancerogeni e/o mutageni, 2002.

Coordinamento tecnico per la sicurezza nei luoghi di lavoro delle Regioni e delle Province autonome. Linee guida per l'applicazione del D. Lgs 626/94: Documento n.10. Luoghi di lavoro, 1998.

Coordinamento tecnico per la sicurezza nei luoghi di lavoro delle Regioni e delle Province autonome. Linee guida per l'applicazione del D. Lgs 626/94: Documento n.14. La movimentazione manuale dei carichi, 1998.

Corradi M., Romano C., Mutti A. Laboratory animal; allergy; asthma. *Med. Lav.* 102, 428-444 (2011)

D.Lgs. 17 marzo 1995, n. 230: Attuazione delle direttive EURATOM 80/836, 84/467, 84/466, 89/618, 90/64, 92/3 in materia di radiazioni ionizzanti, integrato con il D.Lgs. 26 maggio 2000,

n. 241: Attuazione della direttiva 96/29/EURATOM in materia di protezione sanitaria della popolazione e dei lavoratori contro i rischi derivanti dalle radiazioni ionizzanti, integrato e corretto con il D.Lgs 9 maggio 2001, n. 257: Disposizioni integrative e correttive del decreto legislativo 26 maggio 2000, n. 241, recante attuazione della direttiva 96/29/EURATOM in materia di protezione sanitaria della popolazione e dei lavoratori contro i rischi derivanti dalle radiazioni ionizzanti.

D'Orsi F., Guerriero G., Pietrantonio E. La valutazione del rischio chimico. EPC libri. (2006).

D'Ovidio MC., Martini A., Signorini S. Nuovi strumenti per lo studio delle allergie occupazionali di origine animale. *G. Ital Med Lav Ergon.* 29, 489-491 (2007)

D'Ovidio MC., Martini A., Signorini S. Value of the microarray for the study of laboratoro animal allergy (LAA). *G Ital Med Lav Ergon.* 33, 109-116 (2011)

D'Ovidio MC.,Wirz A., Liccardi G., Mellis., Di Renzi S., Riviello MC. Allergia da Animali da Laboratorio (LAA). INAIL. ISBN. 978-88-7484-512-5 (2016)

Decreto del Ministero della Salute 7 settembre 2002 (Recepimento della direttiva 2001/58/CE riguardante le modalità della informazione su sostanze e preparati pericolosi immessi in commercio).

Decreto Legislativo 116/92 - Attuazione della direttiva n. 86/609/CEE in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici.

Decreto Legislativo 14 marzo 2003, n.65 - Attuazione delle direttive 1999/45/CE e 2001/60/CE relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura dei preparati pericolosi. (Pubblicato nel Supplemento Ordinario n. 61/L alla Gazzetta Ufficiale n. 87 del 14 aprile 2003)

Decreto Legislativo 28 luglio 2008, n. 145 - Attuazione della direttiva 2006/121/CE, che modifica la direttiva 67/548/CEE concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative in materia di classificazione, imballaggio ed etichettatura delle sostanze pericolose, per adattarele al regolamento (CE) n. 1907/2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) e istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche

Decreto Legislativo 3 agosto 2009, n. 106 - Disposizioni integrative e correttive del decreto legislativo 9 aprile 2008, n. 81, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro (G.U. n. 180 del 5 agosto 2009)

Decreto Legislativo 3 febbraio 1997, n. 52 - Attuazione della direttiva 92/32/CEE concernente classificazione, imballaggio ed etichettatura delle sostanze pericolose. (GU n.58 del 11-3-1997 - Suppl. Ordinario n. 53)

Decreto legislativo 4 dicembre 1992, n. 475 - Attuazione della direttiva 89/686/CEE del Consiglio del 21 dicembre 1989, in materia di ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative ai dispositivi di protezione individuale e s.m.i.

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 (G.U. n. 101 del 30 aprile 2008)

Decreto Legislativo n. 206/2001 - Attuazione della direttiva 98/81/CE che modifica la direttiva 90/219/CE, concernente l'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati

Decreto Ministeriale 1 dicembre 2004 n.329 - Regolamento recante norme per la messa in servizio ed utilizzazione delle attrezzature a pressione e degli insiemi di cui all'articolo 19 del decreto legislativo 25 febbraio 2000, n. 93.

Decreto Ministeriale 2 maggio 2001 - Criteri per l'individuazione e l'uso dei dispositivi di protezione individuale (DPI).

Directorate General – Enterprise and Industry of the European Commission. Guidelines on the application of council directive 89/686/EEC of 21 december 1989 on the approximation of the laws of the member states relating to personal protective equipment, 12 aprile 2010. http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/mechanical/files/ppe/ppe_guidelines_en.pdf

Direttiva 2010/63/UE del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea 2010; L276/33

Direttiva 86/609/UE del 24 novembre 1986 concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri relative alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea 1986; L358: 1-29

Direttiva 98/81/CE modifica della direttiva 90/219/CEE sull'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati

Dubin S., Zietz S. Sample size for animal health surveillance. *Lab Anim. (NY)*; 20, 29–33 (1991)

Elliott L., Heederik D., Marshall S., Peden D. Incidence of allergy and allergy symptoms among workers exposed to laboratory animals. *Occup. Environ. Med.* 62, 766-771(2005)

European Agency for Safety and Health at Work. Hazards and Risks associated with manual handling of loads in the workplace, Facts n. 73, (2007)

European Chemical Agency (ECHA). Guida introduttiva al Regolamento CLP. ECHA-09-G-01-IT, 2009. (http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/clp_introductory_it.pdf),

FELASA. FELASA recommendations for the education and training of persons involved in animal experiments. *Laboratory Animals* 15 p. (2001)

FELASA. FELASA guideline for education of laboratory animal technicians (Category A). (2010) www.felasa.org

FELASA Working group: Rüllicke T., Montagutelli X., Pintado B., Thon R., Hedrich H.J. FELASA guidelines for the production and nomenclature of transgenic rodents. *Laboratory Animals* 41, 301-311 (2007)

FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. (2014)

FELASA working group on revision of guidelines for health monitoring of rodents and rabbits: M Mahler (Convenor), M Berard, R Feinstein, A Gallagher, B Illgen-Wilcke, K Pritchett-Corning and M Raspa (2014)

Fish R.E., Brown M.J., Danneman P.J., Karas A.Z. Anesthesia and analgesia in laboratory animals. Academic Press. (2009)

Flecknell P.A. and Waterman-Pearson A. Pain management in animals. Elsevier Health Sciences. (2000)

Flecknell P.A. Laboratory animal anesthesia, Third Edition. London: Academic Press. (2009)

Flower DR. The lipocalin protein family: Structure and function. *Biochem. J.* 318, 1-14 (1996)

Fox J.G. The Mouse in Biomedical Research: Diseases. Academic Press. (2007). ISBN 13 978-0-12-369457-7

Gaudio J., Caskey S.A., *et al*: Strengthening risk governance in Bioscience laboratories. Sandia National Laboratories Report. (2009).

Goldberg A.M. & Hartung T. Protecting more than animals. *Scientific American* 294, 84-91 (2006)

Gonzalez-Buitrago J.M., Ferreira L., Isidoro-Garcia M., Sanz C., Lorente F., Davila I. Proteomic approaches for identifying new allergens and diagnosing allergic diseases. *Clin Chim Acta* 385, 21-27 (2007)

Gordon JW and Ruddle FH. Germline Transmission in Transgenic mice. *Prog Clin Biol Res.* 85:111-24 (1982)

Gordon S., Preece R. Prevention of laboratory animal allergy. *Occupational Medicine* 53, 371-377 (2003)

Gordon S. Laboratory animal allergy: a British perspective on a global problem. *ILAR J.* 42, 37-46 (2001)

Guidance on the transport of laboratory animals. Report of the Transport Working Group, established by the Laboratory Animal Science Association (LASA). *Lab Anim* 39, 1-39 (2005)

Gutierrez-Adan A., Pintado B. Effect of flanking matrix attachment regions on the expression of microinjected transgenes during preimplantation development of mouse embryos. *Transgenic Res.* 9, 81-89 (2000)

Hankenson F.C., Johnston N.A., Weigler B.J., Di Giacomo R.F. Zoonoses of occupational health importance in contemporary laboratory animal research. *Comp Med.* 53, 579-601(2003)

Harwanegg C., Hiller R. Protein microarrays for the diagnosis of allergic disease: state-of-the-art and future development *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* 38, 232-236 (2006)

Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Gonzales AP, Joung JK, Yeh JR. Targeted Mutagenesis in zebrafish using CRISPR RNA-guided Nucleases. *Methods Mol Biol.* 1311:317-34 (2015)

IATA - International Air Transport Association, www.iata.org

ILAR. Guide for the care and use of laboratory animals. VIII Edition. The National Academies Press, Washington, D.C. 220 p. (2011)

ILAR Committee on Long-Term Holding of Laboratory Rodents. Long-term holding of laboratory rodents. *ILAR News* 19, L1-25 (1976)

ISPESL- Dipartimento Tecnologie di Sicurezza. Linee guida per l'individuazione degli indumenti di protezione contro i rischi meccanici nell'uso di coltelli a mano. Settembre 2000. (http://www.ispesl.it/sitodts/linee_guida/Monteporzio/linee%20guida%20DPI%20coltelli%20.pdf)

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* Aug 17;337(6096):816-21 (2012)

Kim H., Lee J., Jung Y., Cho B., Chae K., Hwang D. Establishing an appropriate period of acclimatization following transportation of laboratory animals. *Exp. Anim.* 58, 11-17 (2006)

Kimura Y. & Janagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod.* 52, 709-720 (1995)

Kohn D.F. Anesthesia and analgesia in laboratory animals. Academic Press. (1997)

LAR - Live Animal Regulations Manual. The Global Standard for the Transportation of Live Animals by Air. (2011)

Larese Filon F., Siracusa A., Rui F., Matteucci G., Pace ML., Fiorito A., Morucci P., Marabbini A. Prevalenza dell'allergia professionale negli animali di laboratorio in due città del nord e del centro Italia *Medicina del Lavoro* 93, 87-94 (2002)

Legge 26 aprile 1934, n.653 - Tutela del lavoro delle donne e dei fanciulli

Li M.W., McGinnis L., Zhu L., Lawitts J., Biggers J., Lloyd K.C. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) enables rescue of valuable mutant mouse strains. *Biol. Reprod.* 69, 2100-2108 (2003)

Lipman N.S. Design and management of research facilities for mice. In: *The Mouse in Biomedical Research*. Vol. 3 Normative Biology, Husbandry, and Models. Fox JG, Barthold SW, Davisson M, Newcomer CE, Quimby FW, Smith AL, eds, p. 271-319. Academic Press, USA (2007)

Lois C., Hong EJ., Pease S., Brown EJ., Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* Feb. 1; 295:868-7 (2002)

Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. Feb 15;339(6121):823-6 (2013)

Messineo A., Battistini S., Caspani P., Bosco G.: Linee guida sui dispositivi di protezione individuale della Regione Lazio (Azienda USL capofila Roma H) (2009)

Ministero della Difesa. Direzione generale della Sanità Militare. Linee guida per fronteggiare la pandemia influenzale da virus A/H1N1v. (2009)

Nagy A., Lunenfeld S., Vintersten K., Behringer R. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual -Third Edition*. Anderson Cancer Center (2003). ISBN 978-087969591-0.

Newcastle Consensus Meeting on Carbon Dioxide Euthanasia of Laboratory Animals. University of Newcastle upon Tyne, UK (2006)

Newcomer C.E., Fox J.G. Zoonoses and other human health hazards. In: Fox JG, Barthold SW, Davisson MT, Newcomer CE, Quimby FW, Smith AL, eds. *The Mouse in Biomedical Research, Vol. II, Diseases*. 2nd edn. San Diego, CA: Academic Press. 719–745 p. (2007)

Nicklas W., Baneux P., Boot R., *et al.* Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab. Anim.* 36, 20–42 (2002)

Nicklas W., Deeny A., Diercks P., Gobbi A., Illgen-Wilcke B., Seidelin M. FELASA guidelines for the accreditation of health monitoring programs and testing laboratories involved in health monitoring. *Lab. Anim. (NY)* 39, 43–48 (2010)

Nicklas W., Homberger F.R., Illgen-Wilcke B., Jacobi K., Kraft V., Kunstyr I., Mähler M., Meyer H., Pohlmeier-Esch G. Implications of infectious agents on results of animal experiments. *Lab. Anim.* 33(Suppl. 1), 39–87 (1999)

Norma ISO (International standard organisation) 11228-1: Ergonomics – Manual handling. Part 1: Lifting and carrying; Part 2: Pushing and pulling; Part 3: Handling of low loads at high frequency (2003)

Norma tecnica EN 1082 – protezione contro tagli e ferite da coltelli a mano

Norma tecnica EN 133 - Apparecchi di protezione delle vie respiratorie – Classificazione

Norma tecnica EN 134 - Apparecchi di protezione delle vie respiratorie. Nomenclatura dei componenti.

Norma tecnica EN 136 - Apparecchi di protezione delle vie respiratorie. Maschere intere. Requisiti, prove, marcatura.

Norma tecnica EN 14126 - Indumenti di protezione - Requisiti prestazionali e metodi di prova per gli indumenti di protezione contro gli agenti infettivi.

Norma tecnica EN 143 - Apparecchi di protezione delle vie respiratorie - Filtri antipolvere - Requisiti, prove, marcatura

Norma tecnica EN 149 - Dispositivi di protezione delle vie respiratorie - Semimaschere filtranti antipolvere - Requisiti, prove, marcatura

Norma tecnica EN 166 - Protezione personale degli occhi – Specifiche

Norma tecnica EN 374-1 Guanti di protezione contro prodotti chimici e microorganismi - Parte 1: Terminologia e requisiti prestazionali.

Norma tecnica UNI EN 374-2 Guanti di protezione contro prodotti chimici e microorganismi - Parte 2: Determinazione della resistenza alla penetrazione.

Norma tecnica EN 388 – Guanti di protezione contro rischi meccanici.

Norma tecnica EN 407 – Guanti di protezione contro rischi termici (calore e/o fuoco).

Norma tecnica EN 511 Guanti di protezione contro il freddo.

Norma tecnica UNI EN 1005-2: Sicurezza del macchinario. Prestazione fisica umana: movimentazione manuale di macchinario e di parti componenti il macchinario.

Occupational Safety and Health Administration – OSHA. Personal protection equipment (PPE), (2010). <http://www.osha.gov/SLTC/personalprotectiveequipment/>

OSHA. Occupational safety and health guidelines for nitrogen. (1996) <http://www.osha.gov/SLTC/healthguidelines/nitrogen/recognition.html>

Palmiter R.D., Chen H.Y., Brinster R.L. Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell*. 29, 701-710 (1982)

Park F., Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis?. *Physiol Genomics*. Oct 22; 31:159-73 (2007)

Percy D.H., Barthold S.W. Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits. 3rd edn. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell. (2007)

Perry A.C., Wakayama T., Kishikawa H., Kasai T., Okabe M., Toyoda Y., Yanagimachi R. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 284, 1180-1183 (1999)

Pfeifer A., Hofmann A. Lentiviral transgenesis. *Methods Mol Biol*. 530:391-405 (2009)

Pfeifer A., Lim T., Zimmermann K. Lentivirus transgenesis. *Methods Enzymol*. 477, 3-15 (2010)

Pinkert C. Transgenic Animal Technology, 2nd Edition. A Laboratory Handbook Print Book. Academic Press. ISBN: 9780125571661 (2002)

Price J.A., Longbottom J. Allergy to mice. Further characterization of two major mouse allergens (Ag1 and Ag3) and immunohistochemical investigations of their sources. *Clin. Exp. Allergy* 20, 71-77 (1990)

Pritchett-Corning K.R., Cosentino J., Clifford C.B. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats. *Lab. Anim*. 43, 165-173 (2009)

Pritchett-Corning KR, Prins JB, Feinstein R, Goodwin J, Nicklas W, Riley L; Federation of Laboratory Animal Science Associations; American Association for Laboratory Animal Science. AALAS/FELASA Working group on health monitoring of rodents for animal transfer
Jam Assoc Lab Anim Sci. Nov;53(6):633-40 (2014)

Raccomandazione Europea 2007/526/CE

Recommendations for euthanasia of experimental animals. Report of a Working Party.
Laboratory animals. 30 p. (1996)

Regione Liguria. Emergenze epidemiche da malattie trasmissibili. Linee guida per la sorveglianza, l'intervento rapido e il controllo della sindrome respiratoria acuta severa – SARS sul territorio ligure. 2004

Regolamento CE n. 1272/2008 (Classification Labelling Packaging – CLP)

Regolamento CE n. 1907/2006 (Registration Evaluation Authorisation Restriction of Chemicals – REACH)

Regolamento UE n. 453/2010 (modifica del Regolamento CE n. 1907/2006)

Report of the Working Group on Hygiene of the Gesellschaft für Versuchstierkunde-Society for Laboratory Animal Science Implications of infectious agents on results of animal experiments. *Lab Anim.* 33 Suppl 1, S39-87 (1999)

Robertson D.H.L., Cox K.A., Gaskell S.J., Evershed R.P., Benyon R.J. Molecular heterogeneity in the major mouse urinary proteins on the house mouse *Mus musculus*. *Biochem. J.* 316, 265-272 (1996)

Russell, W.M.S & Burch, R.L. The Principles of Humane Experimental Technique 238 p. London: Methuen (1959)

Russell W.M.S & Burch R.L. The Principles of Humane Experimental Technique 238 p. Potters Bar, Herts., UK: UFAW (1992)

Schumacher M.J. Characterization of allergens from urine and pelts of laboratory mice. *Mol. Immunol.* 17, 1087-1095 (1980)

Seamer J.H. and Wood M. Laboratory animal handbooks 5, 2nd revised edition. Safety in the animal house. London Laboratory Animals LTD ISBN 0-901334-09X (1981)

Seamer J.H. and Wood M. Laboratory animal handbooks 13, Health and safety in laboratory animal facilities. The Royal Society of Medicine Press. ISBN 1-85315-421-0 (1999)

Seward J.P. Occupational allergy to animals. *Occup. Med.* 14, 285-302 (1999)

Silverman J. Managing the Laboratory animal facility. CRC Press. (2002)

Siraganian R., Sandberg A. Characterization of mouse allergens. *J Allergy Clin. Immunol* 63, 435-442 (1979)

Szczygiel M.A., Kusakabe H., Yanagimachi R., Whittingham D.G Intracytoplasmic sperm injection is more efficient than in vitro fertilization for generating mouse embryos from cryopreserved spermatozoa. *Biol. Reprod.* 67, 1278-1284 (2002)

The International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxy-2-propanol. Vol 88, (2004)

The International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1,3 Butadiene, Ethylene Oxide and Vinyl Halides (Vinyl Fluoride, Vinyl Chloride and Vinyl Bromide). Vol. 97, (2008)

U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. National Toxicology Program. Report on Carcinogens. Twelfth Edition, (2011)

U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. National Toxicology Program. Report on Carcinogens. Twelfth Edition, (2011)

Virtaner T., Zeiler T., Mantjarvi R. Important animal allergens are lipocalin proteins: Why are they allergenic? *Int. Arch. Allergy Immunol.* 120, 247-258 (1999)

Walls A., Longbottom J. Comparison of rat fur, saliva, and other rat allergen extracts by skin testing, RAST, and RAST inhibition *J Allergy Clin. Immunol.* 75, 242-251 (1985)

White W.J., Chou S.T., Kole C.B., Sutcliffe R. Transportation of laboratory animals. UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals, 8th ed. Hertfordshire: Universities Federation for Animal Welfare, 169-182 p. (2010)

Wood M., Smith M.W. Health and safety in laboratory animal facilities. RSM Press ISBN 978-1-85315-421-8 (1999)

Wood RA. Laboratory Animal Allergens. *ILAR J.* 42, 12-16. Review (2001)

World Health Organization. Laboratory safety manual. 3th revised edition. Geneva. (2004)

Zuang V., Barroso J., Bremer S., Casati S., Ceridono M., Coecke S., Corvi R., Eskes C., Kinsner A., Pellizzer C., Prieto P., Worth A., Kreysa J. ECVAM technical report on the status of alternative methods for cosmetics testing (2008-2009). <http://ecvam.jrc.it/index.htm>

Zuang V. *et al.* EURL ECVAM Status Report on the Development, Validation and Regulatory Acceptance of Alternative Methods and Approaches (2016)



Consiglio Nazionale delle Ricerche