

ZF-MED

ZEBRAFISH AND OTHER AQUATIC
MODELS IN MEDITERRANEAN LABS

Giornate studio sull'impiego dei Modelli Acquatici a fini scientifici
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G.Caporale' 15-16 ottobre 2018



ASPETTI NORMATIVI SULL'IMPIEGO DEI PESCI TELEOSTEI A FINI SCIENTIFICI



Zebrafish e non solo.....

- Pesci teleostei nella ricerca biomedica

- Pesci teleostei e 3R

- Pesci teleostei e D.lgs. 26/2014

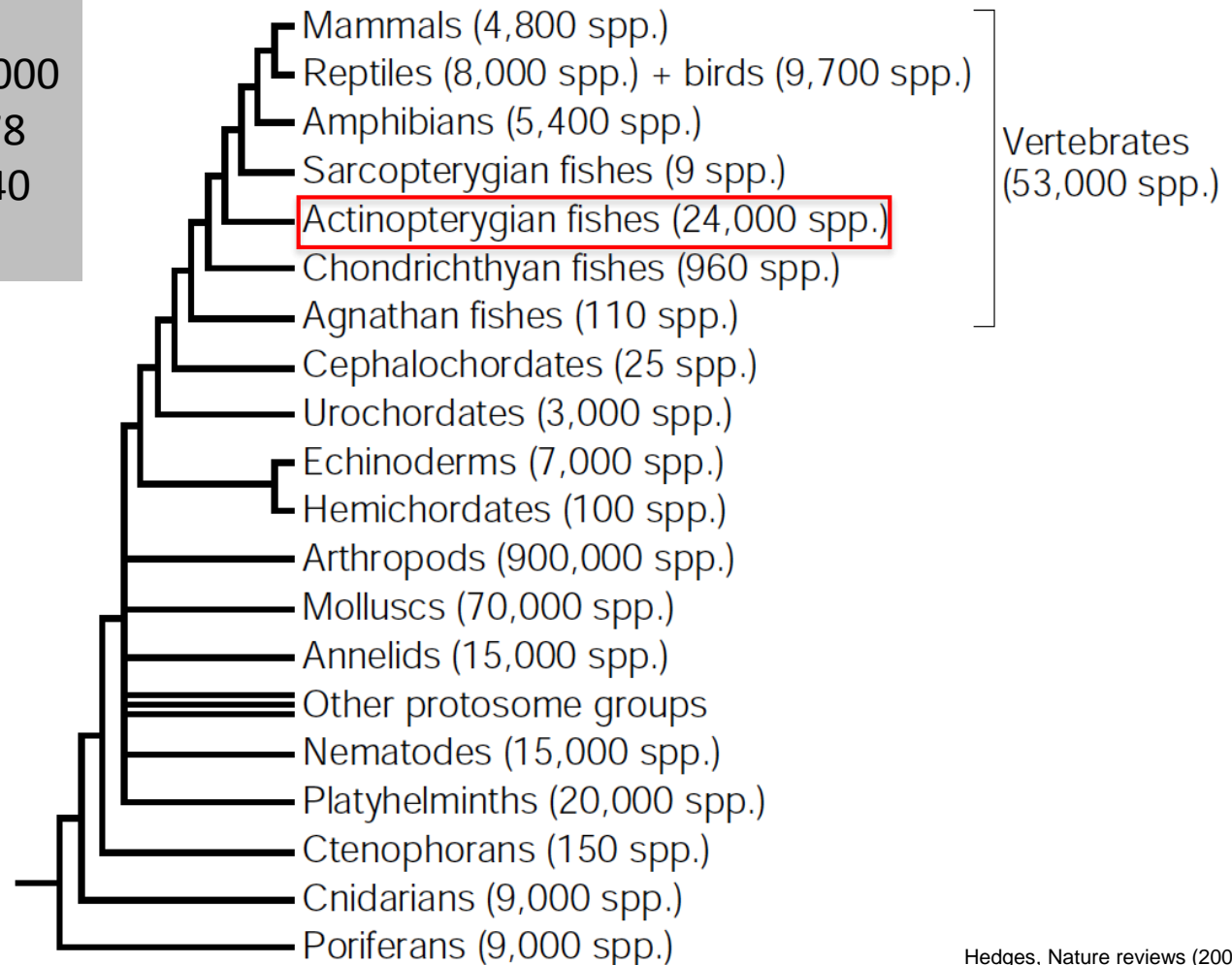


August Krogh
Nobel laureate 1920

‘...for many biological problems there is an animal on which can be mostly convenient studied.’


- *I pesci rappresentano la più antica, numerosa e diversificata classe di vertebrati, comprendendo circa il 48% delle specie conosciute nel subphylum Vertebrata.*

I pesci teleostei comprendono più di 24.000 specie suddivise in 4278 generi, 448 famiglie e 40 ordini




PUO' UN PESCE TELEOSTEO ESSERE MODELLO PER L'UOMO ?

Superficial App



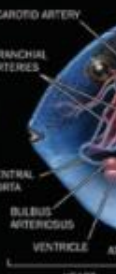
NARE
OPERCULUM

Digestive System

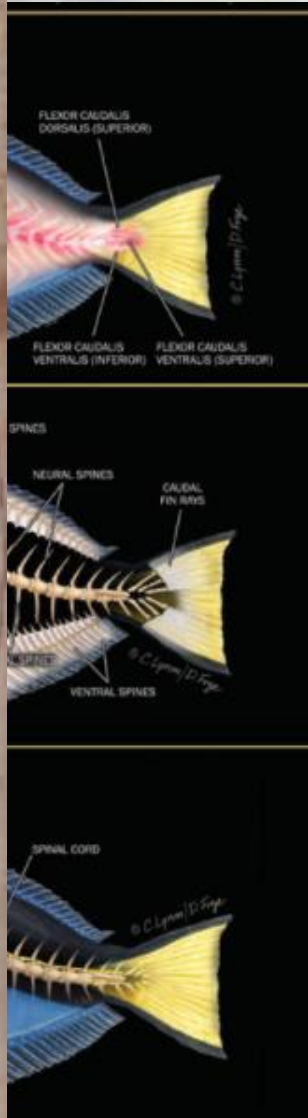
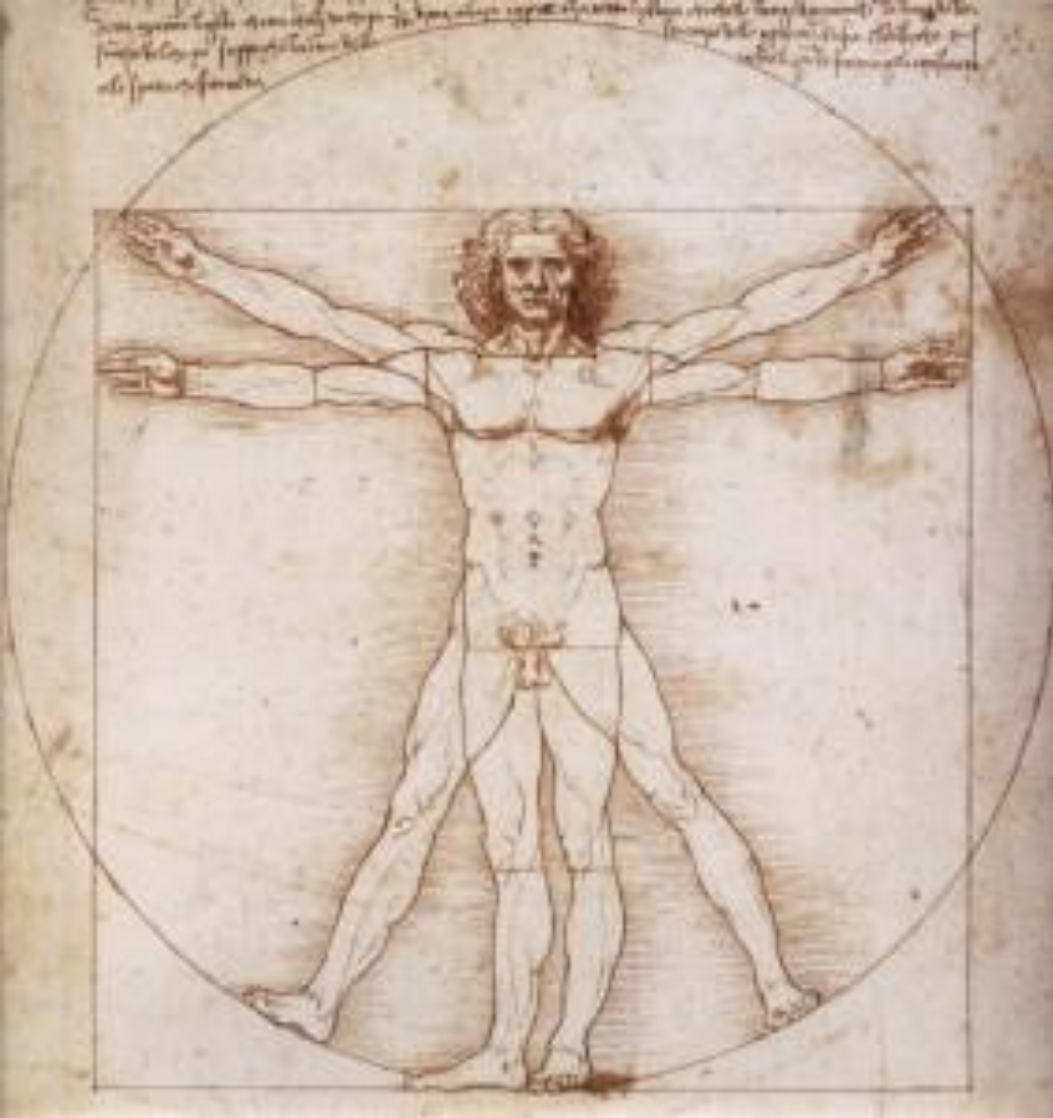


CRANIAL KIDNEY
GILL
LIVER
STOMACH
INTESTINES

Circulatory System



DORSAL AORTA
CAROTID ARTERY
BRANCHIAL ARTERIES
VENTRAL AORTA
BULBUS ARTERIOSUS
VENTRICLE
HEART

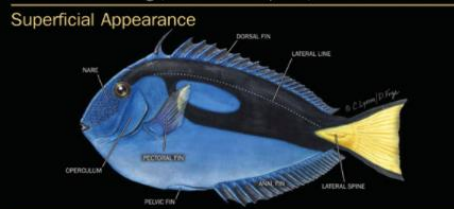
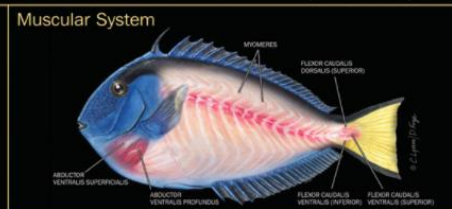
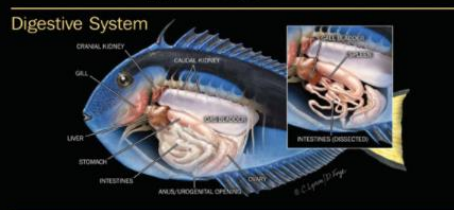
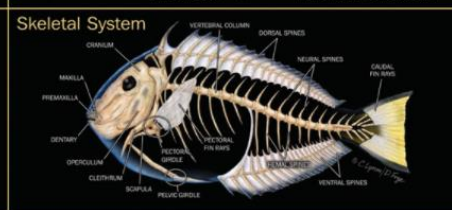
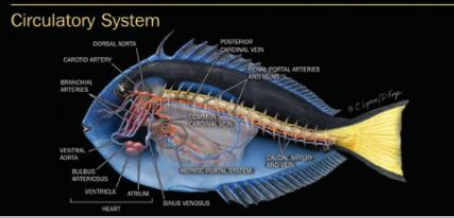
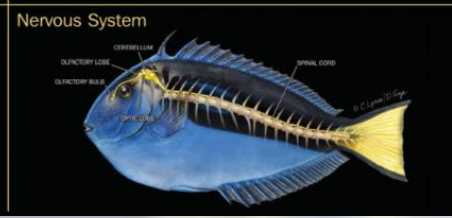


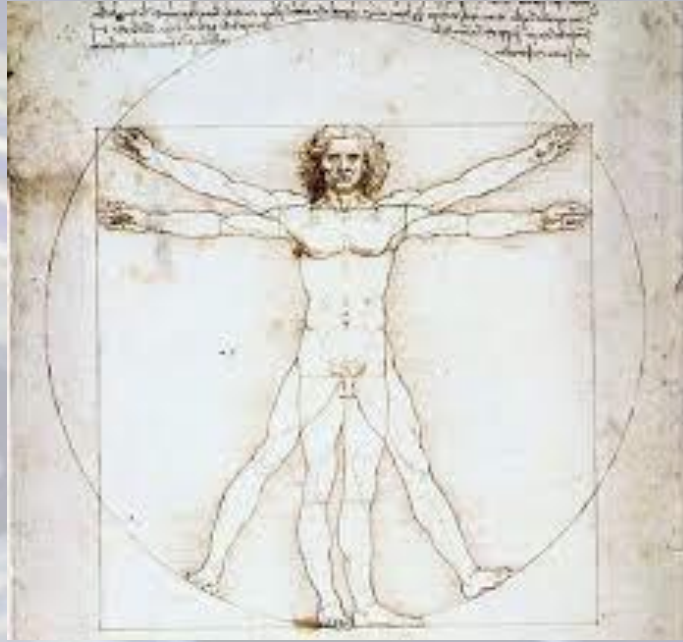
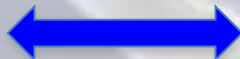
FLEXOR CAUDALIS DORSALIS (SUPERIOR)
FLEXOR CAUDALIS VENTRALIS (INFERIOR)
FLEXOR CAUDALIS VENTRALIS (SUPERIOR)

SPINES
NEURAL SPINES
CAUDAL FIN RAYS
VENTRAL SPINES

SPINAL CORD

Nonostante le ovvie differenze, come vertebrati, i pesci possiedono molte caratteristiche anatomiche e fisiologiche dei mammiferi.

Superficial Appearance 	Muscular System 
Digestive System 	Skeletal System 
Circulatory System 	Nervous System 





Invited review

Anatomical features for the adequate choice of experimental animal models in biomedicine: I. Fishes

Livia D'Angelo^{a,*}, Laura Lossi^{b,c}, Adalberto Merighi^{b,c}, Paolo de Girolamo^a^a Department of Veterinary Medicine and Animal Productions, University of Naples Federico II, Naples, Italy^b University of Turin, Department of Veterinary Sciences, Turin, Italy^c INN, Istituto Nazionale di Neuroscienze, Turin, Italy

General anatomical features of the most used fish in biomedical research.

	Turquoise killifish	Medaka	Zebrafish	Goldfish
Embryonic development	Hatching 12 days after fertilization, as independent feeding larva	Hatching 9 days after fertilization, as independent feeding larva	Hatching 3 days after fertilization, independent feeding after 5 days post fertilization	Hatching 3 days after fertilization, independent feeding after 5 days post fertilization
Digestive apparatus	Oral and pharyngeal teeth Stomach	Oral and pharyngeal teeth Stomachless	Teeth attached to the fifth branchial arch Stomachless	Pharyngeal teeth Stomachless
Reproductive system	Sexual dimorphism	Sexual dimorphism	Sexual dimorphism	Sexual dimorphism
Skin	Highly colorful skin in male	Pigmented skin. 4 types of chromatophores	Five uniformly, pigmented, horizontal stripes on the side of the body	Head without scales
Lateral line	Complete	Subdivided in anterior and posterior lateral line, according to the neuromast position	Subdivided in anterior and posterior lateral line, according to the neuromast position	Complete



A summary of the utilization of different fish species in current biomedical research.

Main field of use		Turquoise killifish	Medaka	Zebrafish	Goldfish
Anatomy and physiology		Basic research (age research)	Basic research (developmental biology)	Basic research (developmental biology)	Basic research (neuro-endocrinestudies)
Applied pharmacology		Drug validation for aging (Valenzano and Cellerino, 2006)	Anticancer drug (Matsuzaki et al., 2013)	General use (Haesemeyer and Schier, 2015)	
Pathology	Cancer and cancerogenesis	Spontaneous tumors in brain, liver and genital apparatus (Di Cicco et al., 2011)	Spontaneous lymphoma, ovarian tumor; induced melanoma, liver tumors, and xenograft (Hasegawa et al., 2009)	Spontaneous and induced tumors, and through transgenesis* and xenograft (White et al., 2013)	
	Toxicology		Ecotoxicity/toxicity tests (Padilla et al., 2009)	Ecotoxicity/drug development (Gaytán and Vulpe, 2014)	Ecotoxicity (Velma and Tchounwou, 2011)
	Neuro-degeneration and neuropathology	Neuro-degeneration (Valenzano et al., 2006)	Retinite pigmentosa (Conte et al., 2015)	Genetic-based pathologies (Newman et al., 2014)	
	Endocrinology and endocrine pathologies			Diabetes Food intake regulation (Matsuda et al., 2012)	Hypothalamic-pituitary axis Food intake regulation (Popesku et al., 2008)
	Genetic pathologies Others		General use (Schartl, 2014)	General use (Schartl, 2014) Cardiovascular diseases (Asnani and Peterson, 2014)	

* Melanoma, pancreatic tumors, T cell lymphoma or leukemia, B cell leukemia, rhabdomyosarcoma, neuroblastoma, lipoma, Ewing's sarcoma, myeloproliferative neoplasms, corticotroph adenoma and neoplasm, testicular germ cell tumor.



I pesci teleostei sono eccellenti modelli



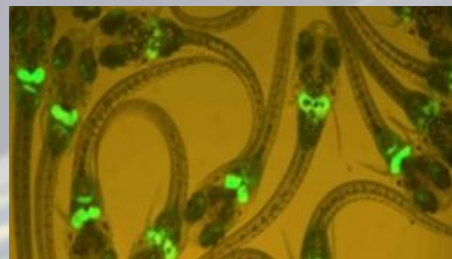
- piccole dimensioni e facilmente manipolabili;
- prole numerosa → crescita rapida → numerose generazioni in tempi rapidi;
- sviluppo embrionale esterno → in molti casi trasparenza ottica dell'embrione;
- ampia possibilità di studi di tipo genetico;
- studi funzionali su larga scala;
- grossa disponibilità di risorse geniche e di strumentazione;
- economicamente più vantaggiosi di altri modelli di vertebrati.

Pesci teleostei : una grande varietà biologica

Modelli evolutivi mutanti:
modelli in cui lo stato di malattia è adattativo

Modelli naturali di malattie umane:
modelli spontanei di malattia

Modelli mutanti:
modelli genetici per lo studio di malattie umane



Modelli di fenotipi adattativi per le malattie

Blindcave fish (*Astyanax mexicanus*): modello per lo studio della degenerazione retinica. I processi evolutivi hanno causato degenerazione del cristallino e della retina



esprimono geni (*pax6*, *sonic hedgehog*) coinvolti nei processi degenerativi della retina umana.

Modelli spontanei di malattia

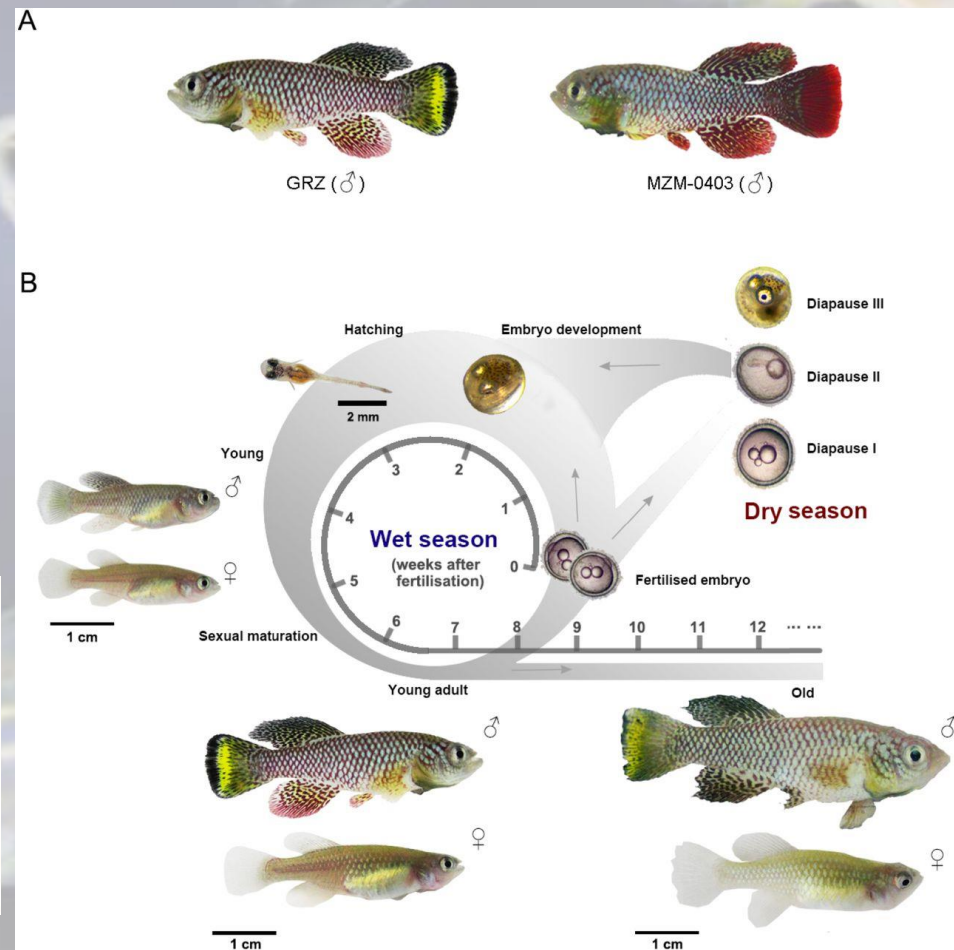
Killifish (*Nothobranchius furzeri*)

modello per lo studio dei processi di invecchiamento

5 settimane



27 settimane



Modelli genetici per lo studio di malattie umane

Zebrafish (*Danio rerio*)



Medaka (*Oryzias latipes*)

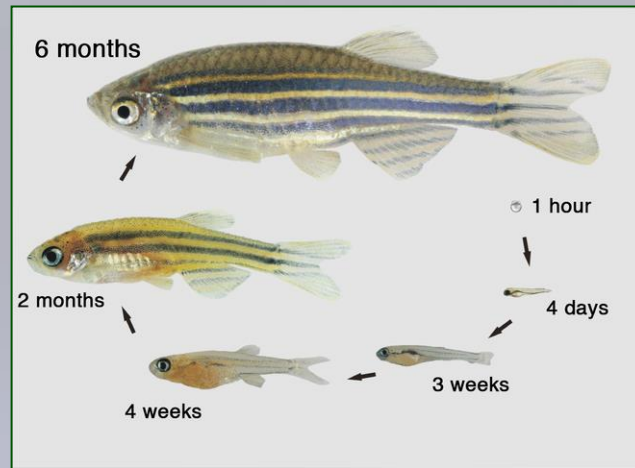


Table 1. Features of evolutionary mutant models for human diseases

Model organism	Scientific name of family/species	Disease modeled	Possibility of maintaining in lab aquaria	Possibility to breeding in the lab	Genomic resources*	Transgenic methods	Cell lines
Platyfish and swordtails	Several <i>Xiphophorus</i> species, in particular <i>X. maculatus</i> , <i>X. hellerii</i> and <i>X. couchianus</i>	Cancer, in particular melanoma; sexual maturation disorders	Yes: easy, standardized conditions established	Yes	Genome of three species completed, others in progress	No	Yes
Antarctic icefish	Several <i>Notothentioidei</i> species	Osteopenia, anemia	Possible, but difficult to culture	No	Genome of one species in progress	No	No
Blind cavefish	<i>Astyanax mexicanus</i>	Retinal degeneration, pigmentation disorders, sleep disorders	Yes: easy	Yes	Genome in progress	Possible	No
Cichlid fish	Several <i>Cichlidae</i> species	Craniofacial malformations	Yes: easy	Yes	Genome of one species completed, others in progress	Possible, established in some cichlid species	No
Amazon molly	<i>Poecilia formosa</i>	Melanoma, thyroid cancer, infectious diseases	Yes: easy, standardized conditions established	Yes	Genome in progress	No	Yes
Eel	<i>Anguilla anguilla</i> , <i>A. japonica</i>	Bone demineralization, Wilms' tumor	Yes	No	Genome in progress	No	Yes
Damselfish	<i>Stegastes partitus</i>	Viral cancers, neurofibromatosis	Yes: easy but needs some skills	Yes, up to larval stages	Genome in progress	No	Yes
Toadfish	<i>Porichthys notatus</i> , <i>Opsanus beta</i>	Hepatic encephalopathy, sickle cell anemia	Yes	Possible, but difficult	Genome in progress	No	No
Mummichog	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Environmental toxicology, intoxication, cystic fibrosis	Yes: easy, standardized conditions established	Yes	Genome in progress	Possible, established in distantly related species	No
Sheepshead minnow	<i>Cyprinodon variegatus</i>	Environmental toxicology, intoxication	Yes: easy, standardized conditions established	Yes	Genome in progress	Possible, established in distantly related species	No
Turquoise killifish	<i>Nothobranchius furzeri</i>	Aging, aging-related diseases	Yes: easy, standardized conditions established	Yes	Genome in progress	Yes, established for the model	Yes
Rainbow trout	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Carcinogen-induced cancer, in particular liver cancer	Yes: large facility necessary, standardized conditions established	Yes	Genome in progress	Yes, established for the model	Yes

*Information on genomes in progress was provided Wesley Warren, Genome Center at Washington University, St Louis, MO.

Il teleosteo più utilizzato nella ricerca biomedica:
***Danio rerio* (zebrafish)**

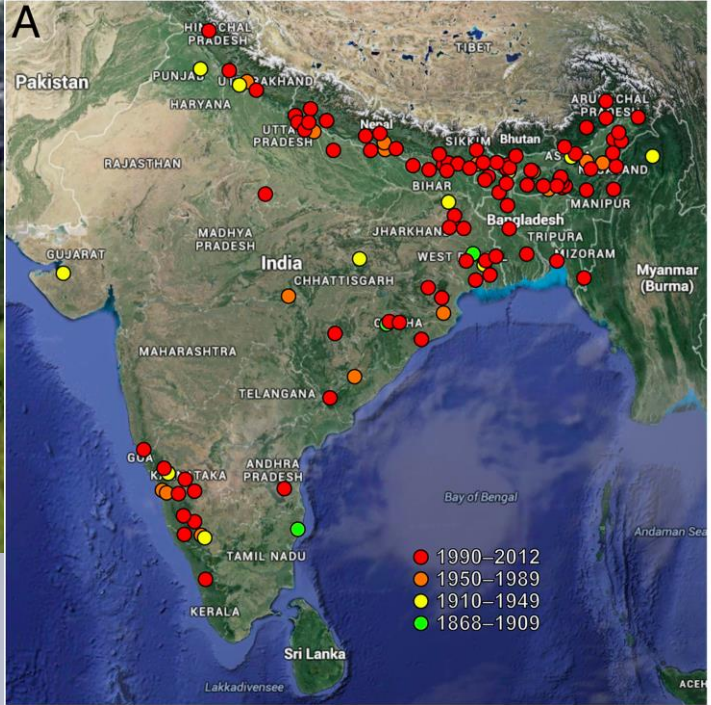


- **genetica dello sviluppo**
 - **neurobiologia**
- **malattie neurodegenerative**
 - **cancerogenesi**
 - **tossicologia**
- **medicina rigenerativa**
 - **immunologia**
 - **malattie infettive**
 - **malattie metaboliche**

Danio rerio (zebrafish)



Habitat naturale



Acquario casalingo



Facility zebrafish

Zebrafish: il nuovo “roditore” da laboratorio?

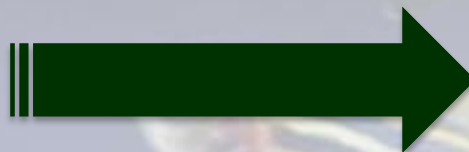


1980

Primo topo
transgenico

2002

genoma
sequenziato



Principale modello
impiegato
nella ricerca
biomedica.

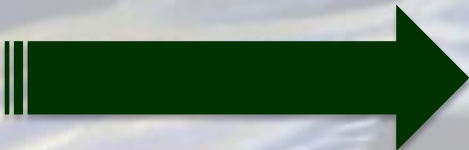


2001

Progetto
Genoma
zebrafish

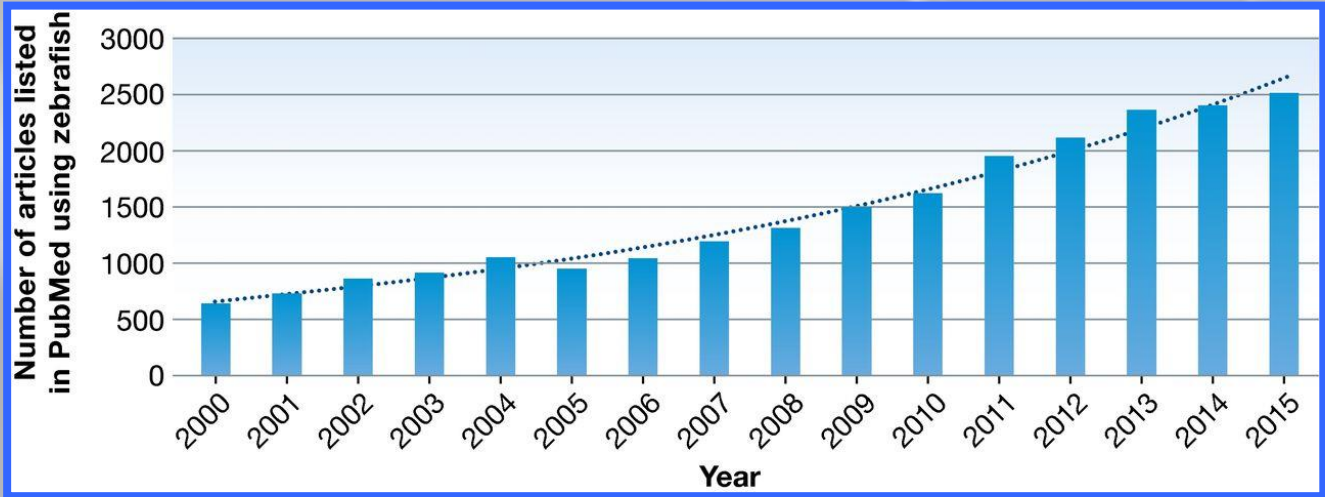
2013

genoma
sequenziato

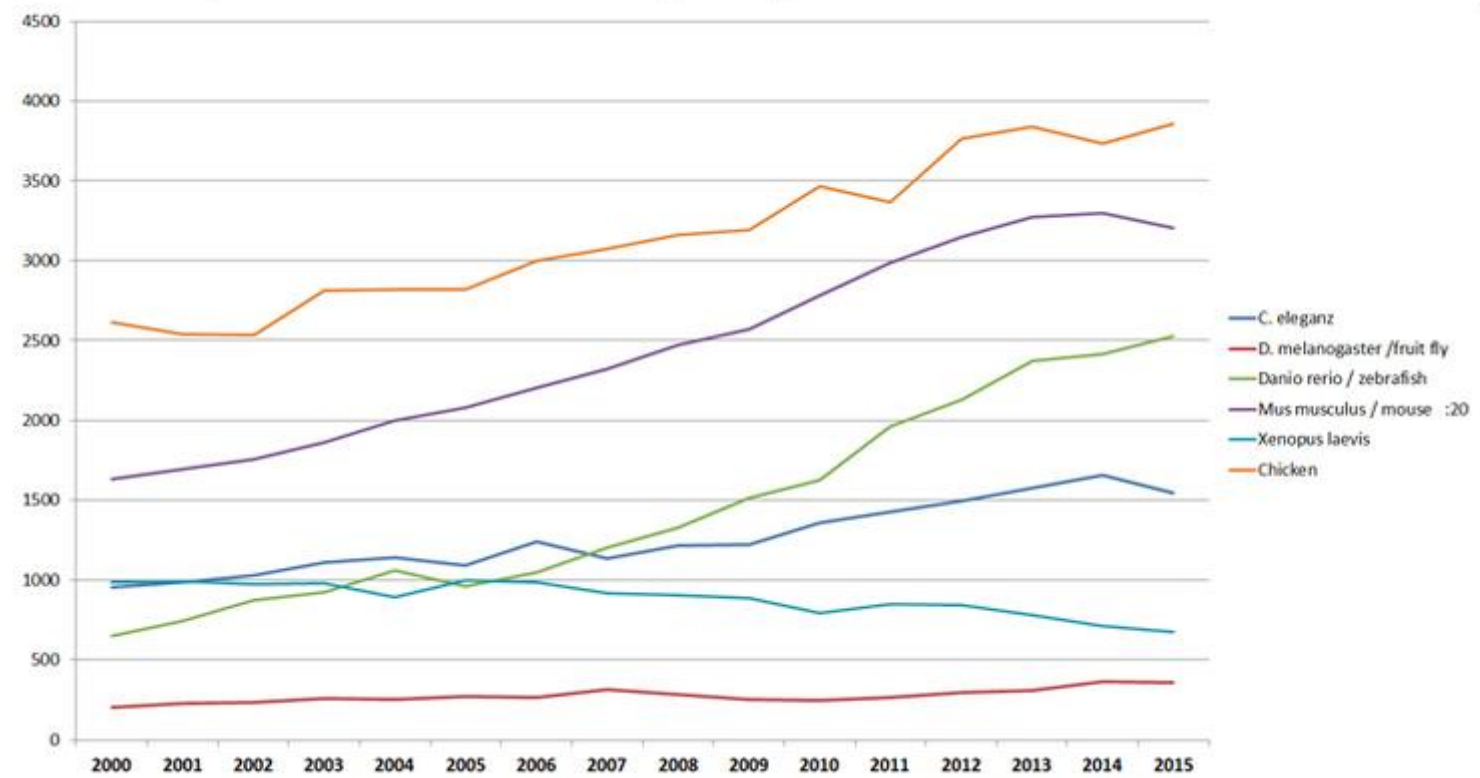


Numerosissime linee
transgeniche disponibili.

Danio rerio (zebrafish)



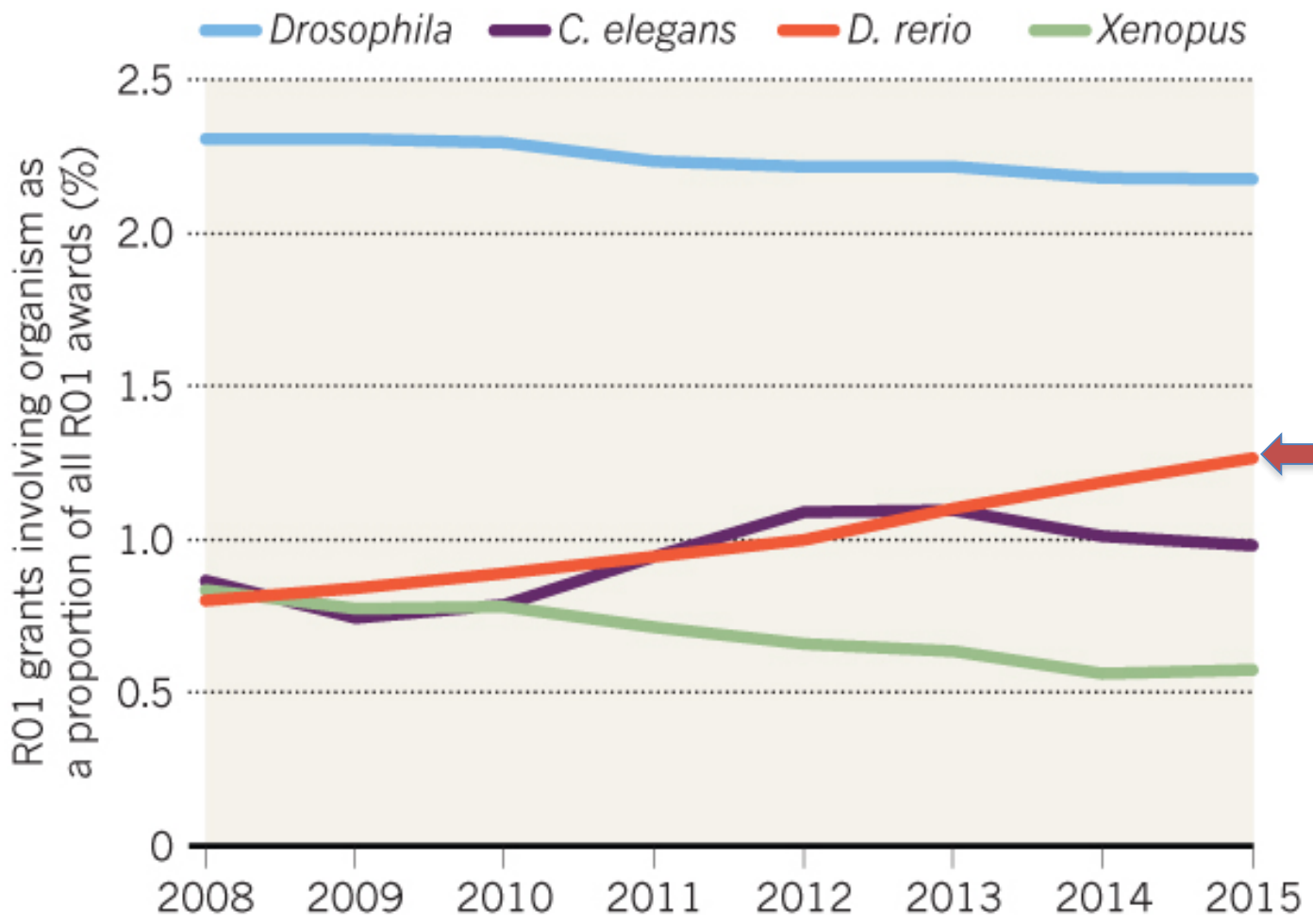
The numbers of publications with zebrafish increase (pubmed)



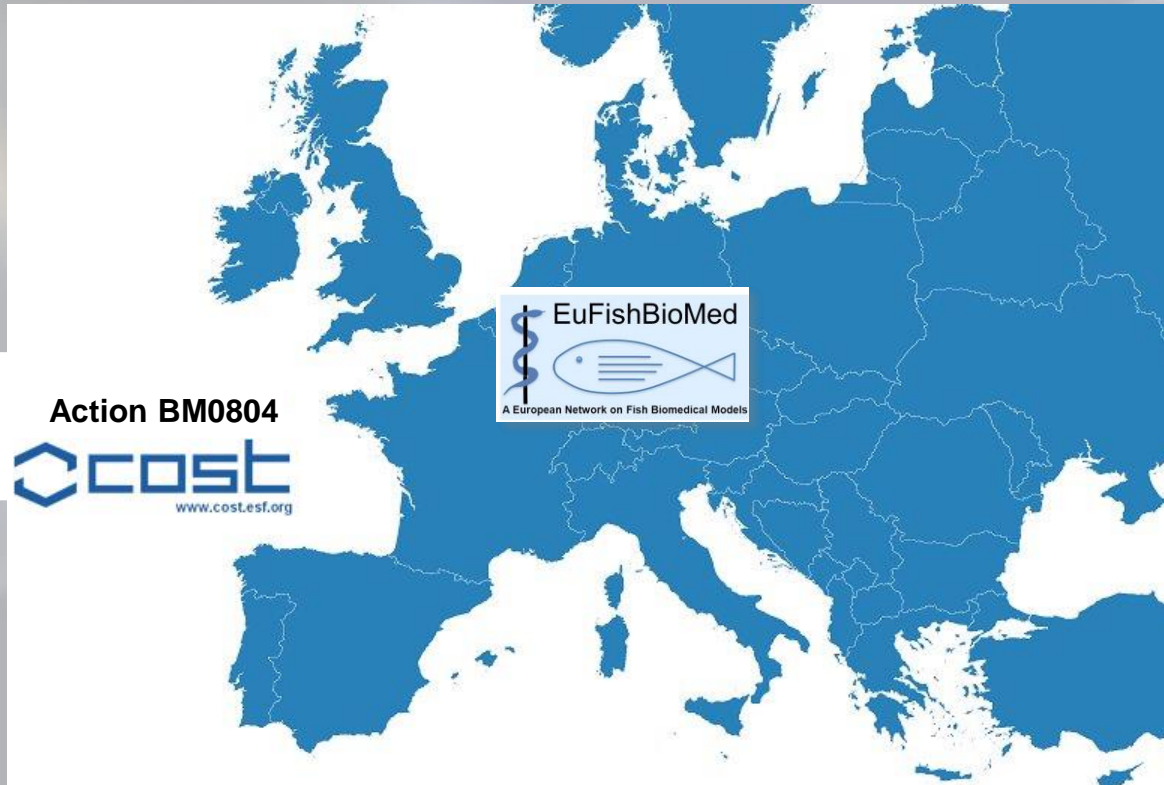
EuFishBioMed e.V.: Uwe Strähle, Larissa Kaufmann (adapted from pubmed July 2016)

ZEBRAFISH COURT FUNDING DOLLARS

Grants for zebrafish (*Danio rerio*) research from the US National Institutes of Health's R01 award programme are on the rise.



Comunità zebrafish.....



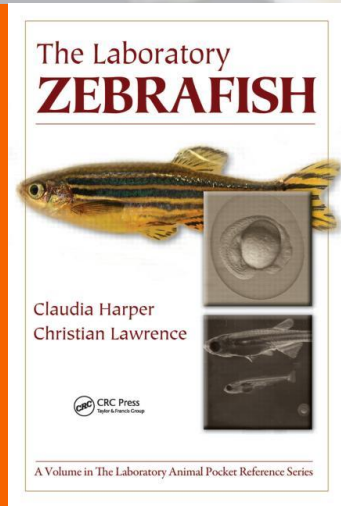
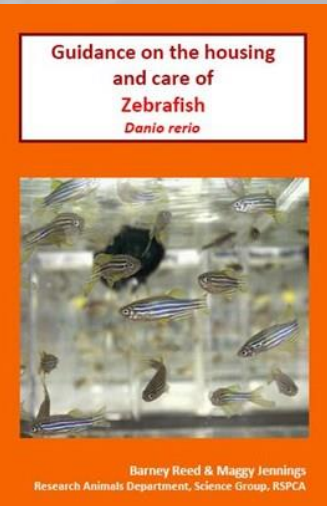
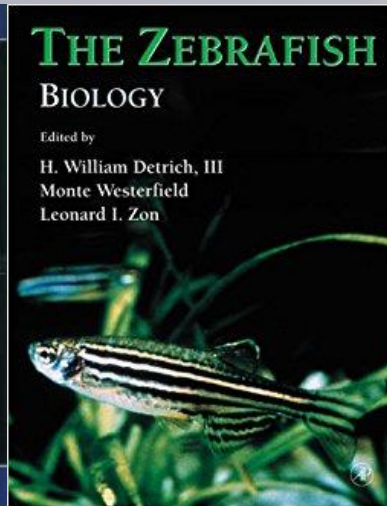
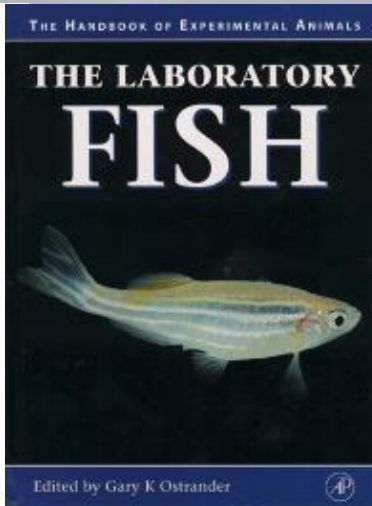
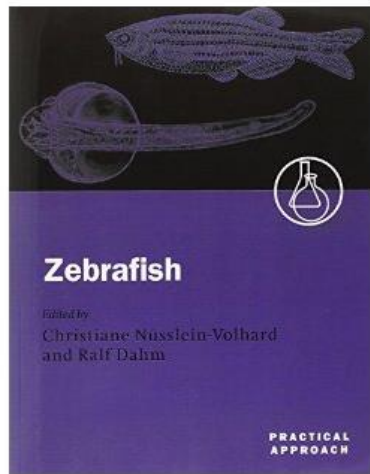
<https://zebrafish.org/home/guide.php>



<https://zfin.org/>

> 330 Labs in EuFishBioMed

...anche dedicata a promuovere l'ottimizzazione degli standard di allevamento degli zebrafish



Zebrafish Husbandry Association

<http://zhaonline.org/index.html>

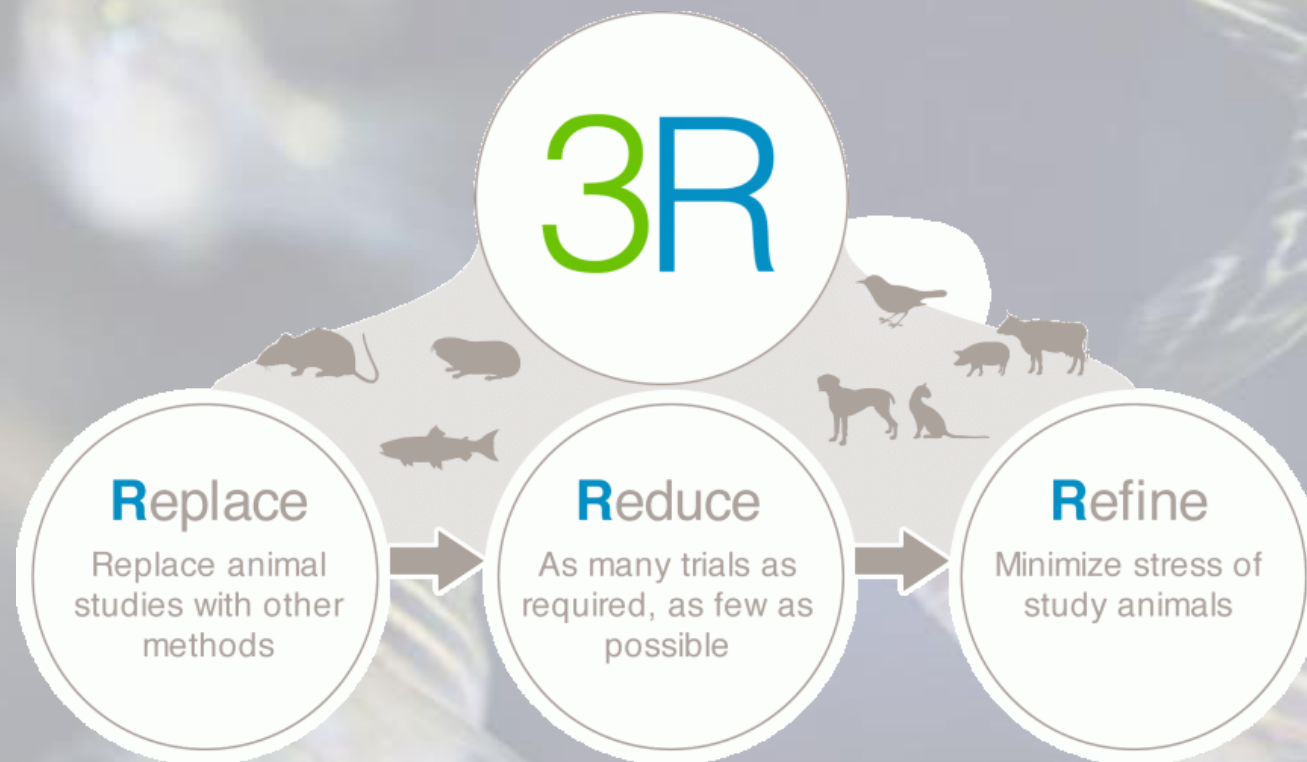
joint FELASA/COST action BM0804 EuFishBioMed

FELASA	COST
Livia D'Angelo (AISAL)	Peter Alestrom (Norway) (CONVENOR)
Daniel Schorderet (SGV)	Paul Midtlyng (Norway)
Frédéric Sohm (AFSTAL)	Stefan Schulte - Merker (Germany)
Susan Warner (Scand-LAS)	

Tasks

- To review available information and to issue guidelines on basic housing and husbandry practices for Zebra fish that promote the animals' health and well-being. These guidelines should address the biology of the species, transportation, reception, safe introduction into facilities, housing systems, environmental (water) conditions, sanitation of equipment, feeding, breeding, identification, nomenclature, background pathology, anaesthesia /analgesia and euthanasia.
- To recommend health monitoring programmes for Zebra fish that consider frequent natural diseases as well as zoonotic risk of personnel.

Manuscript ready to be submitted to Laboratory Animals for peer-review



The Three Rs and
the Humanity Criterion

Michael Balls



An abridged version of

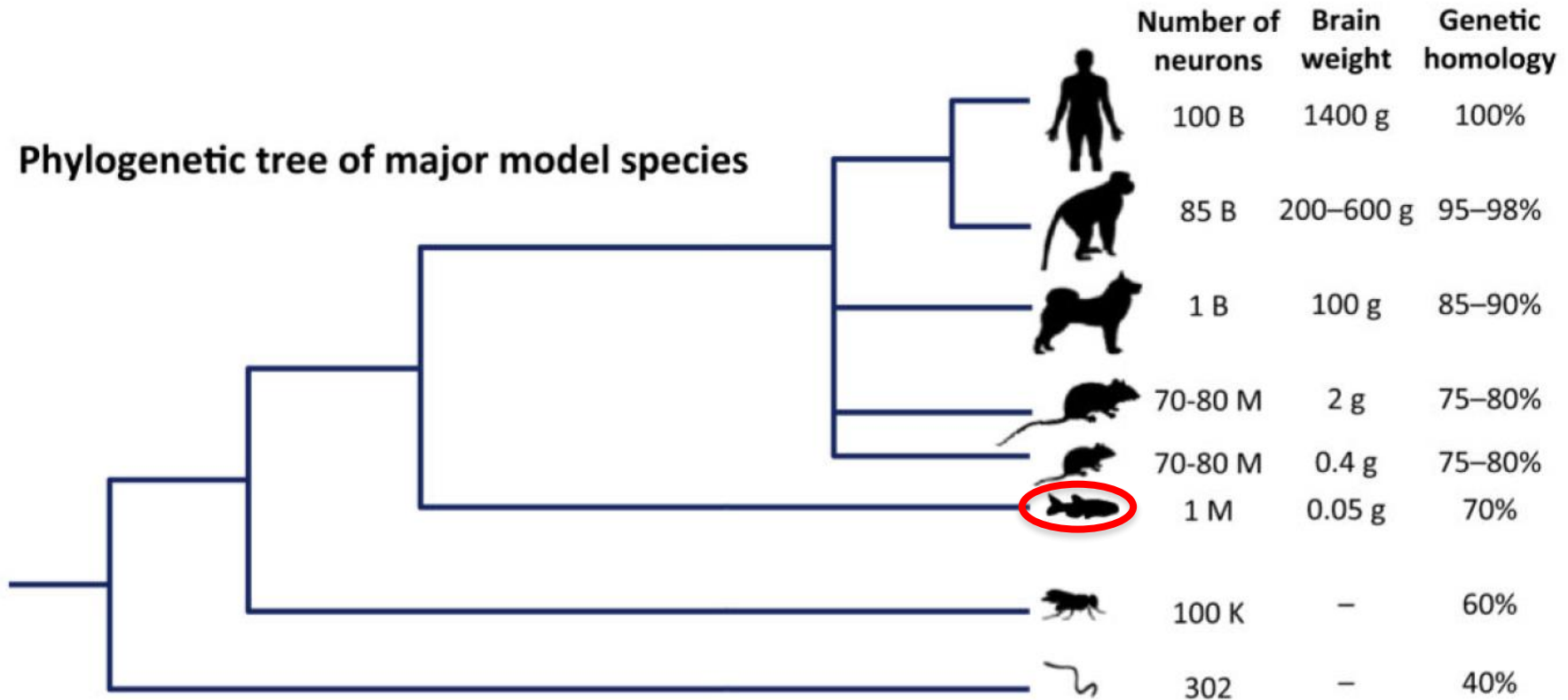
**The Principles of
Humane Experimental Technique**

by W.M.S. Russell and R.L. Burch

Replacement alternatives refers to methods which **avoid** or **replace** the use of animals in an area where animals would otherwise have been used.

This includes both **absolute replacements** (i.e. replacing animals with inanimate systems, such as computer programs) and **relative replacements** (i.e. replacing more sentient animals, such as vertebrates, with animals that current scientific evidence indicates have a significantly lower potential for pain perception, such as some invertebrates). **Russell and Burch, 1959**

Pesci: modelli di replacement relativo

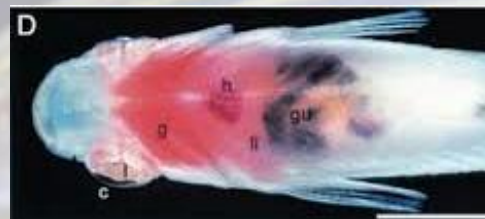
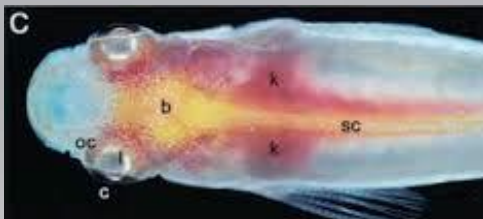


adapted by Stewart et al., Trends Neurosci., (2014)

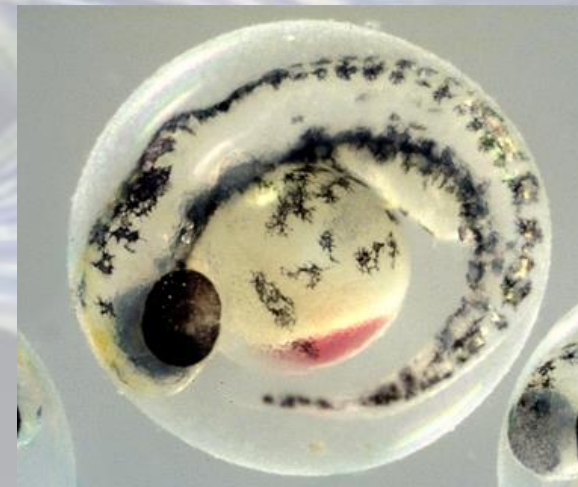
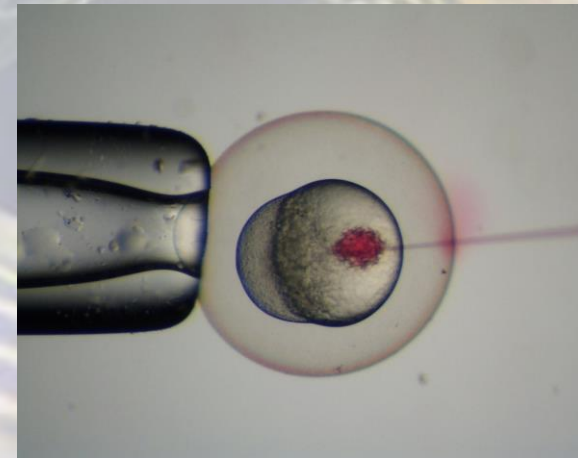
I pesci possono anche essere un modello di refinement

Per alcuni studi sperimentali, come lo sviluppo, la disponibilità di embrioni e forme larvali permette di condurre procedure o di visualizzare processi che sarebbero estremamente invasivi o impossibili da vedere nel caso di embrioni intrauterini.

see-through medaka



Embrioni



DIRECTIVES

DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL
of 22 September 2010
on the protection of animals used for scientific purposes
(Text with EEA relevance)

SERIE GENERALE

Spediz. abb. post. - art. 1, comma 1
Legge 27-02-2004, n. 46 - Filiale di Roma

Anno 155° - Numero 61

GAZZETTA UFFICIALE

DELLA REPUBBLICA ITALIANA

PARTE PRIMA

Roma - Venerdì, 14 marzo 2014

**SI PUBBLICA TUTTI I
GIORNI NON FESTIVI**

DECRETO LEGISLATIVO 4 marzo 2014, n. 26.

**Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla
protezione degli animali utilizzati a fini scientifi-
ci. (14G00036)** *Pag. 2*

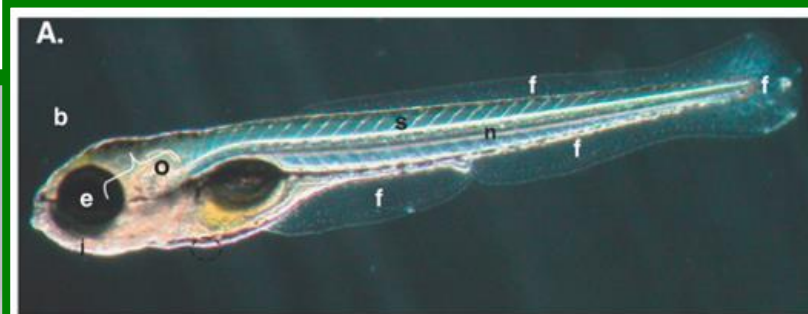
3. Il presente decreto si applica ai seguenti animali:

a) animali vertebrati vivi non umani, comprese:

1) forme larvali capaci di alimentarsi autonomamente;

2) forme fetali di mammiferi a partire dall'ultimo terzo del loro normale sviluppo;

b) cefalopodi vivi.



ALLEGATO I

Elenco degli animali di cui all'articolo 10, comma 1

1. Topo (*Mus musculus*)
2. Ratto (*Rattus norvegicus*)
3. Porcellino d'India (*Cavia porcellus*)
4. Criceto siriano (o dorato) (*Mesocricetus auratus*)
5. Criceto cinese (*Cricetulus griseus*)
6. Gerbillo della Mongolia (*Meriones unguiculatus*)
7. Coniglio (*Oryctolagus cuniculus*)
8. Cane (*Canis familiaris*)
9. Gatto (*Felis catus*)
10. Tutte le specie di primati non umani
11. Rana [*Xenopus (laevis, tropicalis)*], Rana (*temporaria, pipiens*)
12. Pesce zebra (*Danio rerio*)

Art. 4. Autorità competenti

1. Ai fini del presente decreto le **AUTORITÀ COMPETENTI** sono il Ministero della Salute, le regioni, le province autonome di Trento e di Bolzano, i comuni e le aziende sanitarie locali secondo gli ambiti di rispettiva competenza.

.....

3. L'azienda sanitaria locale territorialmente competente ove ha sede lo stabilimento è l'autorità competente a svolgere attività di vigilanza negli stabilimenti utilizzatori e attività ispettiva negli stabilimenti di allevamento o di fornitura di animali destinati ad essere usati nelle procedure o per impiegare i loro organi o tessuti ai fini scientifici, con o senza scopo di lucro.

.....

5. Salvo quanto disposto dai commi 2, 3 e 4, l'autorità competente per le finalità del presente decreto è il Ministero della Salute.



Direzione generale della sanità animale e dei farmaci veterinari



Ufficio VI: Tutela del benessere animale, igiene zootecnica e igiene urbana veterinaria

Finalità delle procedure

1. Le procedure possono essere eseguite unicamente per i seguenti fini:

a) la ricerca di base;

b) la ricerca applicata o traslazionale che persegue uno dei seguenti scopi:

1) la profilassi, la prevenzione, la diagnosi o la cura delle malattie, del cattivo stato di salute o di altre anomalie o dei loro effetti sugli esseri umani, sugli animali o sulle piante;

2) la valutazione, la rilevazione, il controllo o le modificazioni delle condizioni fisiologiche negli esseri umani, negli animali o nelle piante;

3) il benessere degli animali ed il miglioramento delle condizioni di produzione per gli animali allevati a fini zootecnici;

c) per realizzare uno degli scopi di cui alla lettera b) nell'ambito dello sviluppo, della produzione o delle prove di qualità, di efficacia e di innocuità dei farmaci, dei prodotti alimentari, dei mangimi e di altre sostanze o prodotti;

d) la protezione dell'ambiente naturale, nell'interesse della salute o del benessere degli esseri umani o degli animali;

e) la ricerca finalizzata alla conservazione delle specie;

f) l'insegnamento superiore o la formazione ai fini dell'acquisizione, del mantenimento o del miglioramento di competenze professionali;

g) le indagini medico-legali.

2. Non possono essere autorizzate le procedure:

- a) per la produzione e il controllo di materiale bellico;
- b) per i test tossicologici con i protocolli della Lethal Dose - LD50 e della Lethal Concentration - LC50, tranne i casi in cui risulti obbligatorio da legislazioni o farmacopee nazionali o internazionali;
- c) per la produzione di anticorpi monoclonali tramite l'induzione dell'ascite, qualora esistano corrispondenti altri metodi di produzione e non risulti obbligatorio da legislazioni o farmacopee nazionali o internazionali;

Art. 42. Disposizioni transitorie e finali

1. Le disposizioni di cui all'articolo 5, comma 2, lettere d) ed e), ed all'articolo 16, comma 1, lettera d), si applicano a decorrere dal 1° gennaio 2017 (proroga al 2020);

f) nel corso delle esercitazioni didattiche svolte nelle scuole primarie, secondarie e nei corsi universitari, ad eccezione della formazione universitaria in medicina veterinaria nonché dell'alta formazione universitaria dei medici e dei medici veterinari.

Art. 6.

Metodi di soppressione

1. La soppressione degli animali avviene:
 - a) con modalita' che arrecano il minimo dolore, sofferenza e distress possibile;
 - b) secondo i metodi di cui **all'allegato IV**; c) da personale competente ai sensi dell'articolo 23;.....

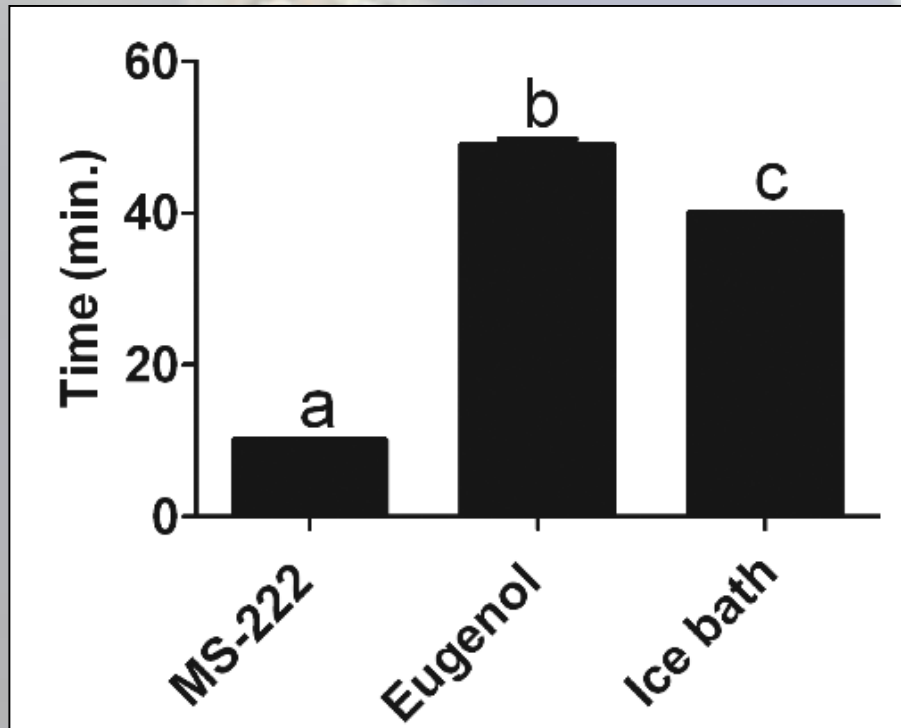
4. Quando permangono **CONDIZIONI DI SOFFERENZA INSOSTENIBILI**, si procede immediatamente alla soppressione dell'animale con metodi umanitari sotto la responsabilita' del medico veterinario designato di cui all'articolo 24. **E' considerata sofferenza insostenibile quella che nella normale pratica veterinaria costituisce indicazione per l'eutanasia.**

Animali – osservazioni/metodi	Pesci	Anfibi	Rettili	Uccelli	Roditori	Conigli	Cani, gatti, furetti	Grandi mammiferi	Primati non umani
Overdose di anestetico	MS222 ≥300 mg/L >10 min.	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
Proiettile captivo			(2)						
Biossido di carbonio					(3)				
Dislocazione cervicale				(4)	(5)	(6)			
Colpo da percussione alla testa Colpo da percussione alla testa				(7)	(8)	(9)	(10)		
Decapitazione				(11)	(12)				
Elettrocuzione	(13)	(13)		(13)		(13)	(13)	(13)	
Gas inerti (Ar, N ₂)								(14)	
Colpo a proiettile libero con fucili, pistole e munizioni adeguate			(15)				(16)	(15)	

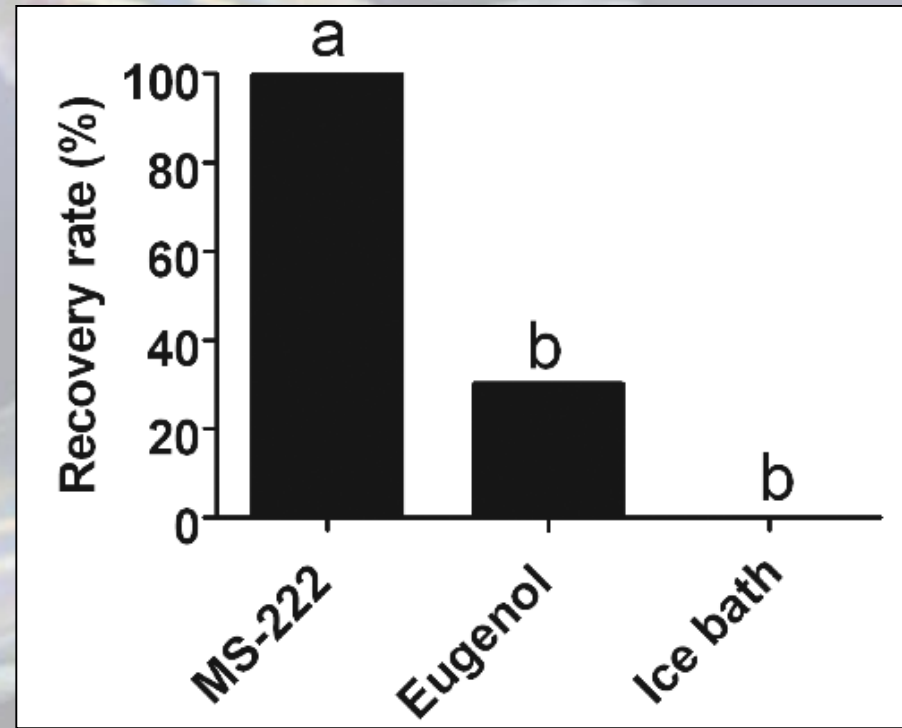
Effectiveness of Recommended Euthanasia Methods in Larval Zebrafish (*Danio rerio*)

Jennifer L Strykowski^{1,2} and Joseph M Schech^{2,*}

MS222 (900 mg/L), eugenolo (1500 μ L/L), and shock ipotermico (acqua e ghiaccio $\leq 4^{\circ}$ C)



Cessazione battito cardiaco



Percentuale di ripresa

Capo III PROCEDURE

Art. 13.

Scelta dei metodi

.....

2. Qualora il ricorso all'impiego di animali è inevitabile sono seguite, a parità di risultati, le procedure che:

a)richiedono il minor numero di animali;

b) utilizzano animali con la minore capacità di provare dolore, sofferenza, distress o danno prolungato;

c) sono in grado di minimizzare dolore, sofferenza, distress o danno prolungato;

d) offrono le maggiori probabilità di risultati soddisfacenti;

e) hanno il più favorevole rapporto tra danno e beneficio.

.....

**Art. 14.
Anestesia**

- 1. Sono vietate le procedure che non prevedono anestesia o analgesia,** qualora esse causano dolore intenso a seguito di gravi lesioni all'animale, ad eccezione delle procedure per la sperimentazione di anestetici ed analgesici.....
- 3. Cessati gli effetti dell'anestesia o quando questa non sia praticabile, gli animali sono immediatamente sottoposti a un trattamento analgesico adeguato o ad un altro.....**

Journal of the American Association for Laboratory Animal Science
Copyright 2014
by the American Association for Laboratory Animal Science

Vol 53, No 2
March 2014
Pages 198-203

**Efficacy and Safety of 5 Anesthetics in Adult
Zebrafish (*Danio rerio*)**

Chereen Collymore,^{1,*} Angela Tolwani,² Christine Lieggi,^{1,3} and Skye Rasmussen^{1,2}

Immersione in....(=inalazione nei vertebrati terrestri)

Tricaine methanesulphonate (MS222; 200mg/L)

O

etomidate 10 mg/L, pH 7.0-7.5

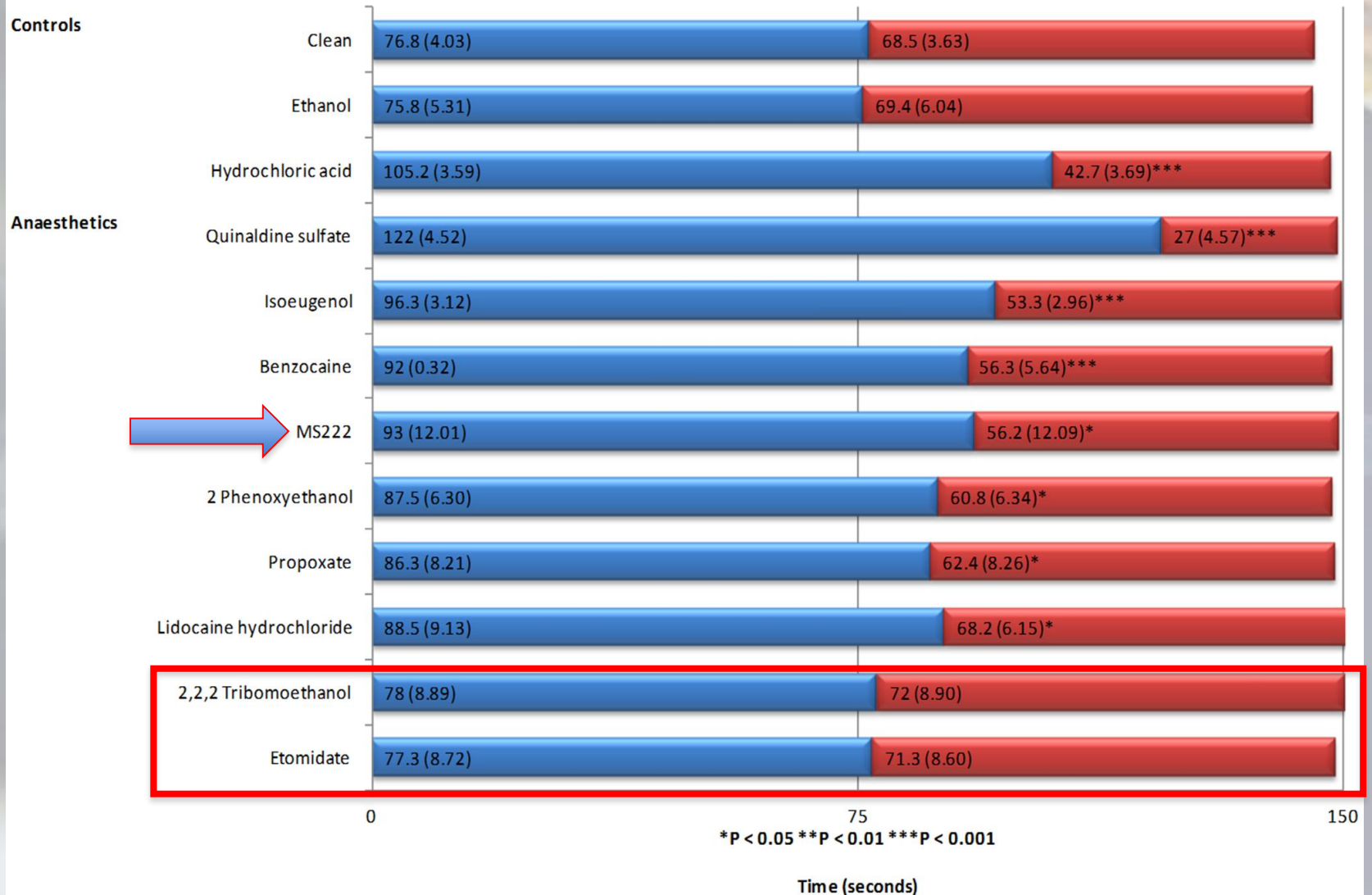
Graduale raffreddamento

(sedazione ed immobilizzazione in procedure non gravi)

Do Fish Perceive Anaesthetics as Aversive?

Gareth D. Readman^{1,2*}, Stewart F. Owen¹, Joanna C. Murrell², Toby G. Knowles²

¹ Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca, Freshwater Quarry, Brixham, Devon, United Kingdom, ² School of Veterinary Science, University of Bristol, Langford House, Langford, North Somerset, United Kingdom



Art. 15.

Classificazione della gravità delle procedure

CLASSIFICAZIONE DELLA GRAVITA' DELLE PROCEDURE

La gravita' della procedura e' determinata in base al livello di dolore, sofferenza, angoscia o danno prolungato cui sara' presumibilmente sottoposto il singolo animale nel corso della procedura stessa.

Sezione I: Categorie di gravità

➔ 1. Le procedure sono classificate, caso per caso, secondo i criteri di assegnazione di cui all'**ALLEGATO VII** del presente decreto, come:

a) non risveglio

Le procedure condotte interamente in anestesia generale da cui l'animale non può riprendere coscienza sono classificate come "non risveglio"

Art. 15.

Classificazione della gravità delle procedure

CLASSIFICAZIONE DELLA GRAVITA' DELLE PROCEDURE

La gravita' della procedura e' determinata in base al livello di dolore, sofferenza, angoscia o danno prolungato cui sara' presumibilmente sottoposto il singolo animale nel corso della procedura stessa.

Sezione I: Categorie di gravità

➔ 1. Le procedure sono classificate, caso per caso, secondo i criteri di assegnazione di cui all'**ALLEGATO VII** del presente decreto, come:

a) non risveglio

Le procedure condotte interamente in anestesia generale da cui l'animale non può riprendere coscienza sono classificate come "non risveglio"

b) Lievi

Le procedure sugli animali che causano probabilmente **dolore, sofferenza o angoscia lievi e di breve durata**, nonché le procedure che **non provocano un significativo deterioramento del benessere** o delle condizioni generali degli animali

Esempi: **tecnica non invasiva per immagini; applicazione di dispositivi telemetrici esterni; riproduzione di animali geneticamente modificati da cui dovrebbe risultare un fenotipo con effetti lievi; controllo elettrocardiografico con tecniche non invasive.....**

c) moderate

Le procedure sugli animali che causano probabilmente **dolore, sofferenza o angoscia moderati e di breve durata**, ovvero **dolore, sofferenza o angoscia lievi e di lunga durata**, nonché le procedure che provocano probabilmente un **deterioramento moderato del benessere** delle condizioni generali degli animali

Esempi: **chirurgia in anestesia generale e somministrazione di idonei analgesici, associata a dolore, sofferenza o deterioramento delle condizioni generali post-chirurgici. toracotomia, craniotomia, laparatomia, orchietomia, linfadenectomia, tiroidectomia, chirurgia ortopedica con stabilizzazione efficace e trattamento delle lesioni, trapianto di organi con trattamento efficace dei rigetti, impianto chirurgico di cateteri o dispositivi biomedici (ad esempio trasmettitori telemetrici, mini-pompe, ecc.);**


d) gravi

Le procedure sugli animali che causano probabilmente **dolore, sofferenza o angoscia intensi**, ovvero **dolore, sofferenza o angoscia moderati e di lunga durata**, nonché le procedure che provocano probabilmente un **deterioramento grave del benessere** o delle condizioni generali degli animali

Prove di tossicità in cui la morte è il punto finale; modelli di induzione di tumori o tumori spontanei che si prevede causino malattia progressiva letale associata a dolore, angoscia o sofferenza moderati di lunga durata ad esempio, tumori che causano cachessia, tumori ossei invasivi, tumori metastatizzati e tumori che causano ulcerazioni; riproduzione di animali con alterazioni genetiche che si prevede causino deterioramento grave e persistente delle condizioni generali, ad esempio morbo di Huntington, distrofia muscolare, nevriti croniche recidivanti.....

Sezione II: Criteri di assegnazione

Sezione III: Esempi di procedure assegnate a ciascuna delle categorie di gravità in base a fattori relativi al tipo di procedura

 Non sono autorizzabili procedure sugli animali che comportano dolori, sofferenze o distress intensi che possono protrarsi e non possono essere alleviati.

Zebrafish e benessere

Fonti di stress:

▪ trasporto

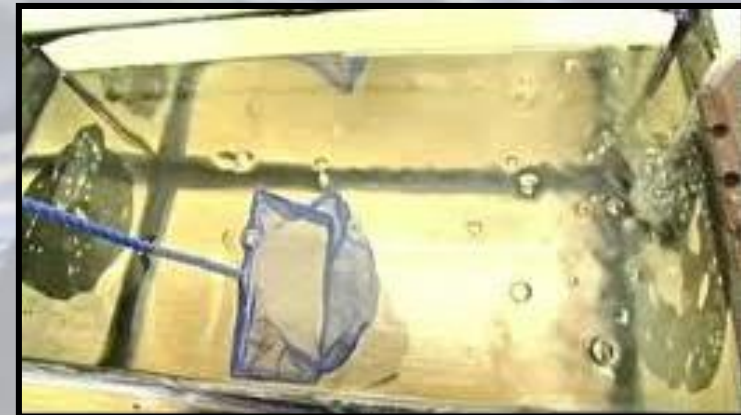
avviene in buste di plastica contenenti pillole di ossigeno, con una densità di 10/2 litri



▪ manipolazione

l'impiego di retini durante il cambi di vaschetta, o nel passaggio da una vaschetta all'altra.

Un'errata manipolazione causa stress, ma anche possibili lesioni al muco di rivestimento superficiale esponendo l'animale a possibili infezioni



Fonti di stress:

▪ **sovraffollamento**

comporta un notevole aumento di stress, con conseguente immunodepressione, aumento di cataboliti nell' H_2O , ridotta fertilità, esposizione ad infezioni.



▪ **malnutrizione**

immunodepressione, scarsa o assente fertilità, esposizione ad infezioni e malattie.

▪ **modifiche dei parametri dell' H_2O**

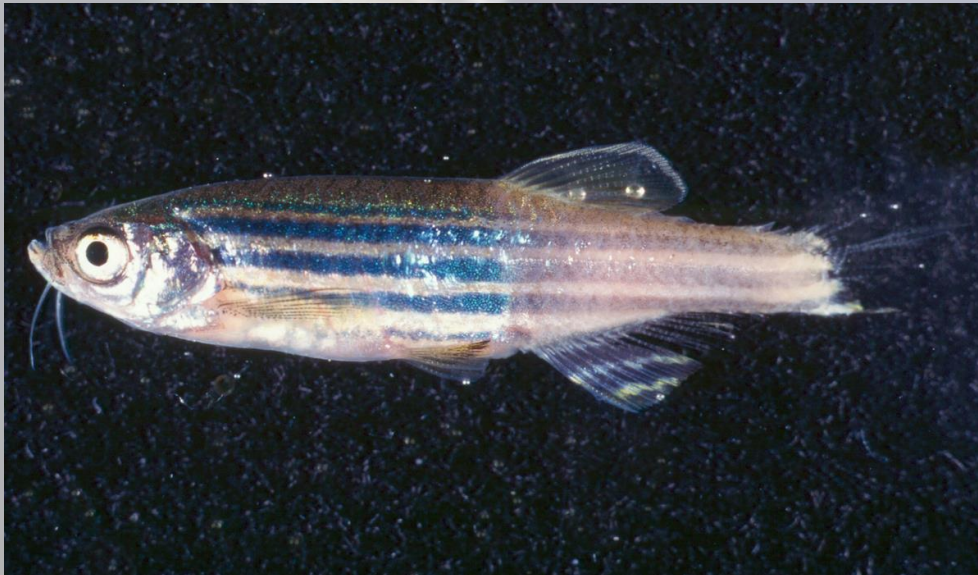
temperatura, ossigeno e salinità.

Come riconoscere lo stress

Osservare :

gli animali, il loro comportamento e l'andamento della colonia
(infezioni, calo nell'ovodeposizione, ristagno di cibo causato da
ridotta assunzione)

alcuni esempi



- ridotta assunzione di cibo
- calo della riproduzione
- maggiore incidenza di infezioni
- squame di rivestimento del corpo

Segni clinici di malattia o di stress

Cambiamenti comportamentali

- Perdita dell'appetito
- Letargia
- Tendenza all'isolamento
- Animali tendono a nascondersi
- Respirazione in superficie
- Pinne bloccate
- Alterazioni nell'equilibrio
- Attività natatoria alterata
- Cambi della frequenza respiratoria

Segni clinici di malattia o di stress

Cambiamenti dell'aspetto

- Lesioni della cute (ulcere, macchie, arrossamenti)
 - Modifiche del colore
 - Perdita di scaglie
 - Protrusione di scaglie
 - Ascite
 - Alterato galleggiamento

Art. 22

Requisiti per impianti, attrezzature, sistemazione e cura degli animali

1 . L'autorità competente di cui all'articolo 4 verifica, nel corso delle ispezioni di cui all'articolo 30, che ogni stabilimento di allevamento, di fornitura e di utilizzazione dispone dei requisiti di cui all'**Allegato III** del presente decreto, **sezione A (sezione generale): [strutture fisiche; ambiente e relativo controllo; cura degli animali];**



....e sezione B (sezione riguardante le singole specie) [fornitura e qualità dell'acqua; ossigeno, composti azotati, ph e salinità; temperatura, illuminazione e rumore; densità di popolazione e complessità ambientale; alimentazione e manipolazione]

14-3-2014

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

Serie generale - n. 61

11. Pesci

14-3-2014

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

Serie generale - n. 61

11. Pesci

11.1. Fornitura e qualità dell'acqua

È necessario fornire continuamente acqua a sufficienza e di qualità adeguata. Il flusso d'acqua nei sistemi di ricircolo o il filtraggio all'interno delle vasche deve essere sufficiente e garantire che i parametri di qualità dell'acqua siano mantenuti a livelli soddisfacenti. Se necessario, l'acqua deve essere filtrata o trattata per eliminare le sostanze che possano nuocere ai pesci. I parametri di qualità dell'acqua devono rimanere sempre entro intervalli accettabili che permettano lo svolgimento dell'attività normale e sostengano la fisiologia di una specie e di una fase di sviluppo determinate. Il flusso d'acqua deve permettere ai pesci di nuotare correttamente e di mantenere un comportamento normale. Deve essere previsto il tempo necessario per l'acclimatazione e l'adattamento dei pesci ai cambiamenti nella qualità dell'acqua.

11.2. Ossigeno, composti azotati, pH e salinità

La concentrazione di ossigeno deve essere appropriata alle specie interessate e al contesto nel quale vivono. Se necessario, deve essere fornita un'aerazione supplementare dell'acqua della vasca. Le concentrazioni di composti azotati devono essere mantenute a un livello basso.

Il pH deve essere adattato alle specie e mantenuto il più possibile stabile. La salinità deve essere adattata alle esigenze della specie ittica e alla fase di sviluppo degli animali. Le modifiche alla salinità devono essere introdotte gradualmente.

11.3. Temperatura, illuminazione, rumore

La temperatura va mantenuta entro l'intervallo ottimale per la specie interessata e mantenuta il più possibile stabile. Le modifiche alla temperatura devono essere introdotte gradualmente. Occorre prevedere un fotoperiodo adeguato ai pesci. I livelli di rumore devono essere mantenuti al minimo e, se possibile, le apparecchiature che causano rumore o vibrazioni, come i generatori o i sistemi di filtraggio, devono essere separate dalle vasche dei pesci.

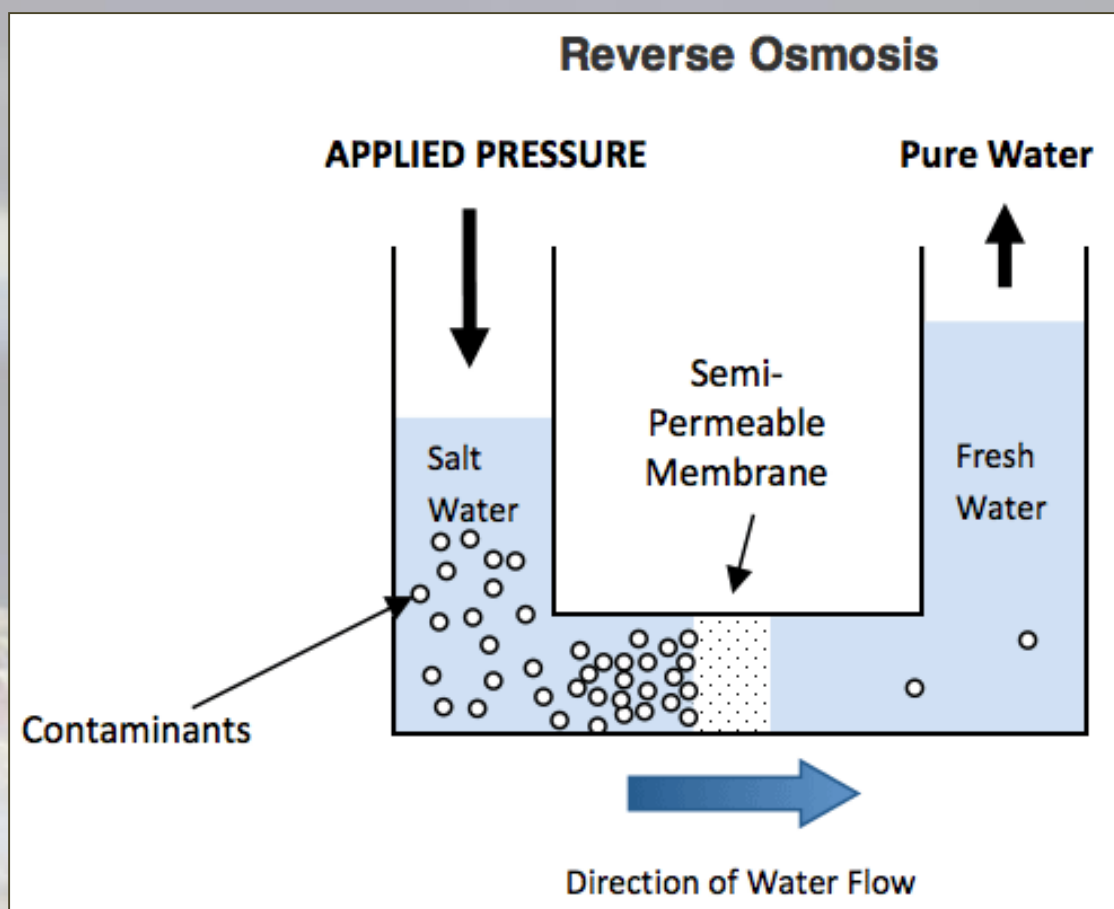
11.4. Densità di popolamento e complessità ambientale

La densità di popolamento deve essere determinata in base alle esigenze complessive dei pesci rispetto a condizioni ambientali, salute e benessere. I pesci devono avere a disposizione un volume d'acqua sufficiente per poter nuotare normalmente tenuto conto della dimensione, dell'età, dello stato di salute e dei metodi di nutrimento. Deve essere

previsto per i pesci un adeguato arricchimento ambientale, ad esempio nascondigli o substrati, a meno che in base ai tratti comportamentali dei pesci non risulti necessario.

11.5. Alimentazione e manipolazione

L'alimentazione deve corrispondere alle esigenze dei pesci, che devono essere nutriti ad una velocità e ad una frequenza adeguate. Occorre prestare particolare attenzione all'alimentazione delle larve, quando si passi da alimenti naturali ad alimenti artificiali. Le operazioni di manipolazione dei pesci sono ridotte al minimo.



Conduttività dell' H_2O = 250 to 600 μS
pH dell' H_2O = 6.5 to 8

Il controllo della conduttività, del pH, del livello di nitriti e nitrati dovrebbe esser eseguito settimanalmente.

Altri parametri

Temperatura: < 26° > 29°
può esser mantenuta riscaldando l' ambiente e non l' H₂O.



Ritmo circadiano (h luce/buio): 12/12 ---> 16/8
con passaggio graduale dalla luce al buio e viceversa



Photo credit: The National Institute of Health (NIH) Zebrafish Facility

Arricchimento ambientale

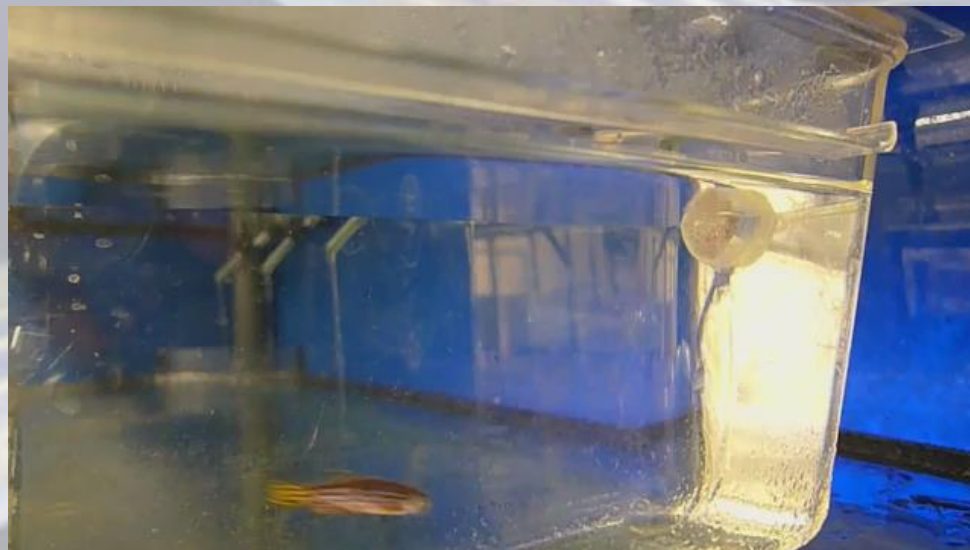
Zebrafish è un animale molto sociale, e in natura è abituato a spazi aperti, senza vegetazione. Per cui non è necessario aggiungere oggetti o piante nelle vasche.



Generalmente, gli zebrafish sono alloggiati **5 adulti/litro d' H₂O**

> densità sono ben tollerate senza troppo stress

possono anche essere mantenuti **isolati**, o **in coppia**, non per troppo tempo poiché tendono ad ingrassare e a ridurre la fertilità, ed avere comportamenti aggressivi.



SISTEMA PER L' ALIMENTAZIONE DI ZEBRAFISH

Sistema manuale

VS

Sistema automatizzato



- > impiego di tempo
- quantità variabile di cibo somministrato
- possibilità di osservare lo stato ed il comportamento degli animali



- risparmio di tempo
- quantità precisa di cibo
- mancato controllo dello stato degli animali

La dieta di zebrafish

schioditoio per artemia



larve di gamberetti, vermi tubifex, cibo secco



- cibo fresco più appetibile, più difficile nella gestione ed inquinante;
- cibo secco più sicuro anche per il veicolo di infezioni.

Art. 31

Autorizzazione dei progetti

1.E' vietata l'esecuzione di progetti di ricerca che prevedono l'utilizzo di animali secondo le finalità di cui all'articolo 5, comma 1, senza la preventiva autorizzazione del Ministero o in modo non conforme alla autorizzazione medesima e ad ogni altra determinazione eventualmente adottata dal Ministero.

2.L'organismo di cui all'articolo 25 inoltra, per via telematica certificata, al Ministero apposita domanda di autorizzazione, allegando:

- a) la proposta del progetto;
- b) la sintesi non tecnica del progetto di cui all'articolo 34;
- c) il modulo di cui all'allegato VI del presente decreto

8 - Il Ministero, invia al richiedente la ricevuta della domanda di autorizzazione con l'indicazione del termine entro cui si intende adottare il provvedimento che **NON PUÒ ESSERE SUPERIORE A QUARANTA GIORNI LAVORATIVI** decorrenti dalla data di ricezione della domanda ed assicura la massima trasparenza e l'accuratezza appropriata al tipo di progetto.

**NON VIGE PIU' LA REGOLA DEL
SILENZIO ASSENSO**
**tranne che per il
prelievo di organi**

14 - Al di fuori delle fattispecie di cui all'articolo 33, **QUALSIASI MODIFICA SIGNIFICATIVA APPORTATA AD UN PROGETTO DI RICERCA DEVE ESSERE COMUNICATA ED ESPRESSAMENTE AUTORIZZATA DAL MINISTERO** con le modalità di cui al presente articolo. L'autorizzazione relativa alle modifiche non produce effetti sul termine di cui al comma 10.

Link utili

- <http://www.eufishbiomed.kit.edu/index.php>
- <http://www.fishbase.org>
- <https://zfin.org/>
- <https://zebrafish.org/home/guide.php>
- http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Index
- <http://biol1.bio.nagoya-u.ac.jp:8000/>
- http://www.ensembl.org/Oryzias_latipes/Info/Index
- **NOTHOBRANCHIUS** - <http://www.nothobranchius.info/>
- <http://africanturquoisekillifishbrowser.org>
- <http://nfingb.leibniz-fli.de>



Grazie per l'attenzione!