

DOLORE, SOFFERENZA E DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Sara Fuochi – DVM Specialista in Scienza e Medicina degli Animali da Laboratorio

Università degli Studi di Trieste

Corso sulla Protezione degli Animali Utilizzati a Fini Scientifici

29 Maggio 2019

DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Premessa

Ricordate sempre...

Dolore, sofferenza, distress sono termini che in linea generale descrivono stati mentali umani.

→ Percezioni umane

→ Esperienza: *tipo di **conoscenza** fornita dalle **sensazioni** o comunque acquisita per il **tramite** dei **sensi** (Treccani).*

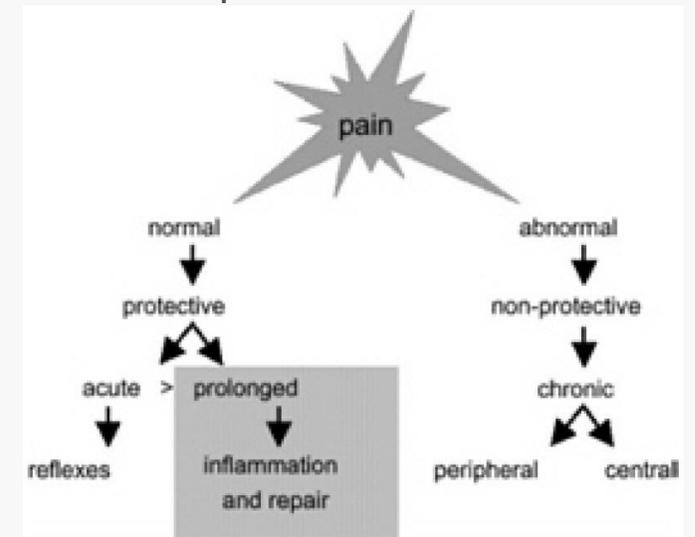
...Può essere difficile creare un parallelo tra sensazioni e stati mentali umani e stati simili negli animali (da laboratorio).

DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Definizione

Definizione di Dolore:

- IASP: “an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in such terms“
- “pain is always subjective”
- Diverse categorie di dolore:
 - Acuto vs Cronico
 - Breve vs Prolungato
 - Protettivo vs Non-protettivo
- E' descritto in termini di sensazione fisica:
“it is the perception or experience of nociceptive stimuli” (FELASA WG)



DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Definizione

Definizione di Sofferenza:

- Il fatto di soffrire dolori fisici o morali (*Treccani*).
- The condition of one who suffers; the bearing of pain or distress. (American Heritage® Dictionary of the English Language)
- The state of undergoing pain, distress, or hardship. (Oxford Dictionary)
- Physical or mental pain that a person or animal is feeling. (Cambridge English Dictionary)
- “a **specific state of mind**, which is not identical to, but might be a consequence of, pain and distress” (FELASA WG)
 - Dolore e distress possono esitare nella sofferenza se di intensità o durata sufficienti.
 - Sofferenza quando dolore o distress non sono più tollerabili per l’animale.
 - Conseguenze negative.

DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Definizione

Definizione di Stress e Distress:

- Lo stress è definito come la risposta biologica che un animale mostra nel tentativo di reagire ad una minaccia alla propria omeostasi.
- La minaccia all'omeostasi è detta *stressor*.
- Non esiste stress se l'animale non percepisce questa minaccia, in modo conscio o subconscio.
- Tutte le risposte – positive o negative – ad uno stressor prevedono una o più delle seguenti risposte biologiche:
 - Comportamentale
 - SNA
 - SNE
 - SI



Risposte allo STRESS: nessuna è per se metodo affidabile per misurare il livello di stress!

DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Definition

Come fa lo Stress a diventare Distress?

Distress è una condizione in cui l'animale deve dedicare sforzi o risorse sostanziali nella risposta adattativa agli stressors.

- Distress NON esiste senza lo stress
 - Distress si genera SOLO QUANDO il costo biologico dello stress impatta negativamente su funzioni biologiche critiche per il benessere dell'animale
- migliori sono le capacità/possibilità di compensare, meno severo è il distress

ANIMALE

DISEGNO
SPERIMENTALE

DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Some behavioral, physiologic, and biochemical indicators of well-being^{a, b}

Behavioral	Physiological	Biochemical
Grooming	Temperature	Corticosteroids
Appetite	Pulse	Catecholamines
Activity	Respiration	Thyroxin
Aggression	Weight loss	Prolactin
Facial expression	Blood-cell count	β -Endorphin
Vocalization	Blood-cell structure	ACTH
Appearance	Cardiac output	Glucagon
Posture	Blood flow	Insulin
Response to handling		Vasopressin Substance P

Come possiamo monitorare la risposta allo stress?

- Risposte del SNE, SNA e SI possono essere insidiose
→ il campionamento stesso induce stress!
- Interruzione di funzioni biologiche → crescita, riproduzione, stato clinico.
- Comportamento

National Research Council (US) Committee on Pain and Distress in Laboratory Animals. Recognition and Alleviation of Pain and Distress in Laboratory Animals. Washington (DC): National Academies Press (US); 1992. 4, Recognition and Assessment of Pain, Stress, and Distress. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK235435/>

DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Qual è la relazione tra Dolore, Sofferenza e Distress?

- Il **dolore** è una sensazione fisica che può dare adito a stati di **sofferenza** fisica o mentale conseguente a (p.es.) lesioni o malattia sistemica.
- **Distress** è la reazione negativa ad uno stressor (p.es dolore) che può inibire la capacità dell'animale di far fronte alla situazione (p.es anoressia in risposta ad una patologia indotta o automutilazione in risposta a dolore/distress psicologico).
- Distress può essere direttamente collegato al Dolore → causa-effetto
- Distress non correlato al Dolore
 - Stressors legati alla manipolazione
 - Stressors legati alla stabulazione

DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Come riconoscere segni di Dolore e Distress?

- Alcuni animali NON mostrano segni di dolore in modo esplicito quanto gli esseri umani → difficoltà valutazione di dolore e distress.
- Specie preda, come roditori, lagomorfi e animali da cortile possono mascherare questi segni molto bene.

PI, tecnici, stabularisti devono essere in grado di riconoscere segni di dolore e distress nelle diverse specie.

- ❖ **Valutazione danno/beneficio**
- ❖ **Impegno personale a garanzia del Benessere Animale**

DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Indicatori di Dolore e Distress: esempi

Table 1 Indicators of pain in several common laboratory animals^a

Species	General behavior	Appearance	Physiology
Rat	Reduced activity; reduced appetite; reduced drinking; licks; guards limbs; self-mutilates; increased aggression and vocalization; aversion toward con-specifics	Ungroomed; piloerection; abnormal stance; hunched posture ("dormouse"); "red tears"; eyelids partly closed; pupils dilated; nasal discharge; recumbent	Sleep disrupted; hypothermia; rapid shallow breathing, may grunt on expiration
Mouse	Similar to rat; increased vibrissal movement	Similar to rat; no ocular porphyrin secretion	Similar to rat
Guinea pig	Squeals, stampedes when handled; or quiet	Similar to rat	Similar to rat
Rabbit	Anxious; hides; squeals or cries; or aggressive; scratches/bites; reduced appetite; cannibalizes young; tonic immobility	May not show large change	Salivates; rapid shallow breathing
Dog	Bites, scratches, guards; whimpers or howls; growls; quiet, submissive; or more aggressive to handling	Stiff, moves less or lies still; "hang-dog" look; tail between legs	Shivers; pants; urinates
Cat	Quiet; hisses or spits; hides; licks excessively; limps; guards limbs; stilted gait; reduced appetite; escape response to handling	Apprehensive facial expression; tucks-in limbs; hunches head/neck; ungroomed; flattens ears; cringes	
Horse	Reluctant to be handled; decreased activity; disrupted feeding; restlessness or depression; reluctance to move; unusual limb position	Anxious appearance; dilated pupils; flared nostrils; glassy eyes; lowers head	Sweats
Nonhuman primate	Screams or moans; reduced feeding and drinking; aggression	Crouches; "sad" facial expression or grimace; may stop grooming	

^a Adapted from Morton DB, Griffiths PHM. 1985. Guidelines on the recognition of pain and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. Vet Rec 116:431-436; NRC [National Research Council]. 1992. Recognition and Alleviation of Pain and Distress in Laboratory Animals. Washington DC: National Academy Press; Soma LR. 1987. Assessment of animal pain in experimental animals. Lab Anim Sci 37:71-74; and Wallace J, Sanford J, Smith W, Spencer V. 1990. The assessment and control of the severity of scientific procedures on laboratory animals. Report of the Laboratory Animal Science Association Working Party. Lab Anim 24:97-130.

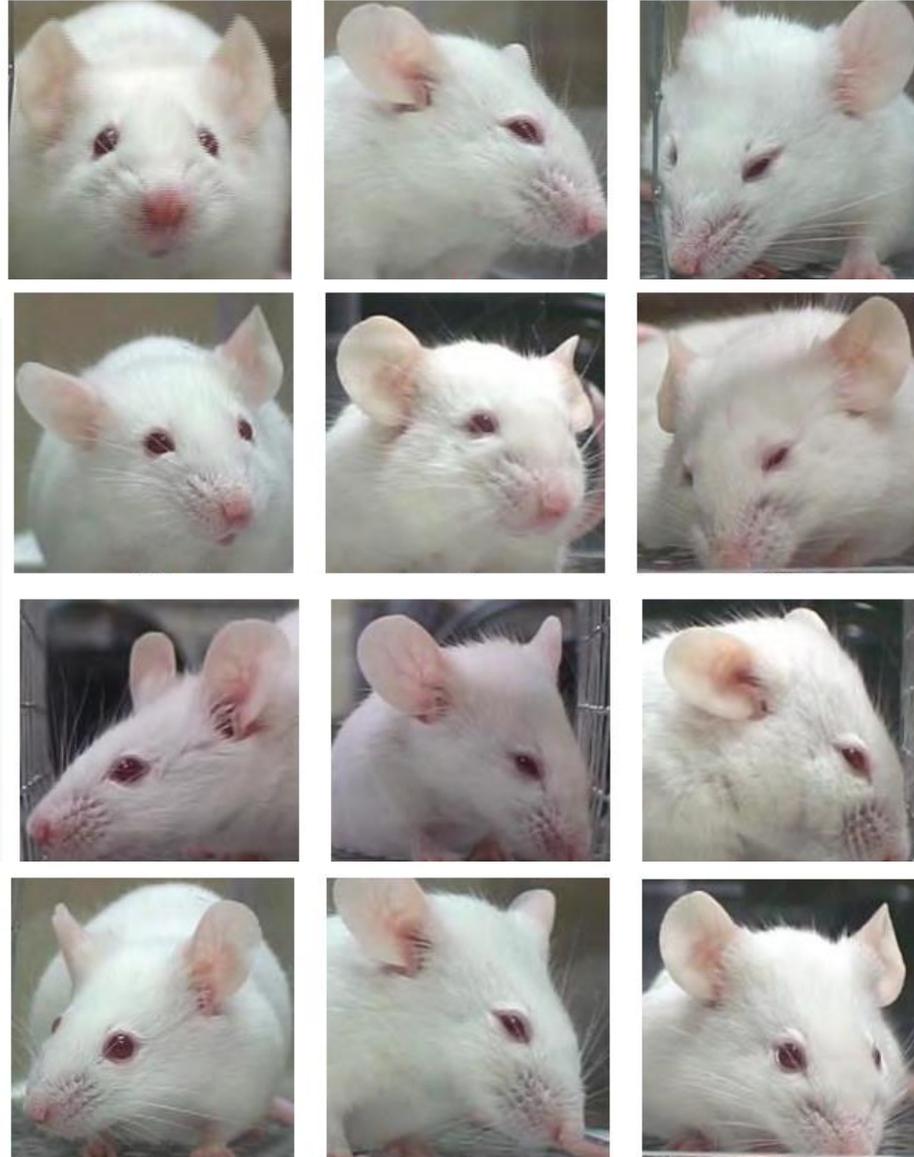
DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Topo

- Mantello poco curato; piloerezione
- Ridotta assunzione di cibo e acqua
- Cifosi
- Decubito
- Espressione Facciale
- Leccamento/autotraumatismi/
atteggiamento di guardia

- Aggressività
- Riduzione/Alterazione comportamenti
sociali (p.es. nest building)
- Pica (lettieria, cannibalismo).

- Vocalizzazioni?



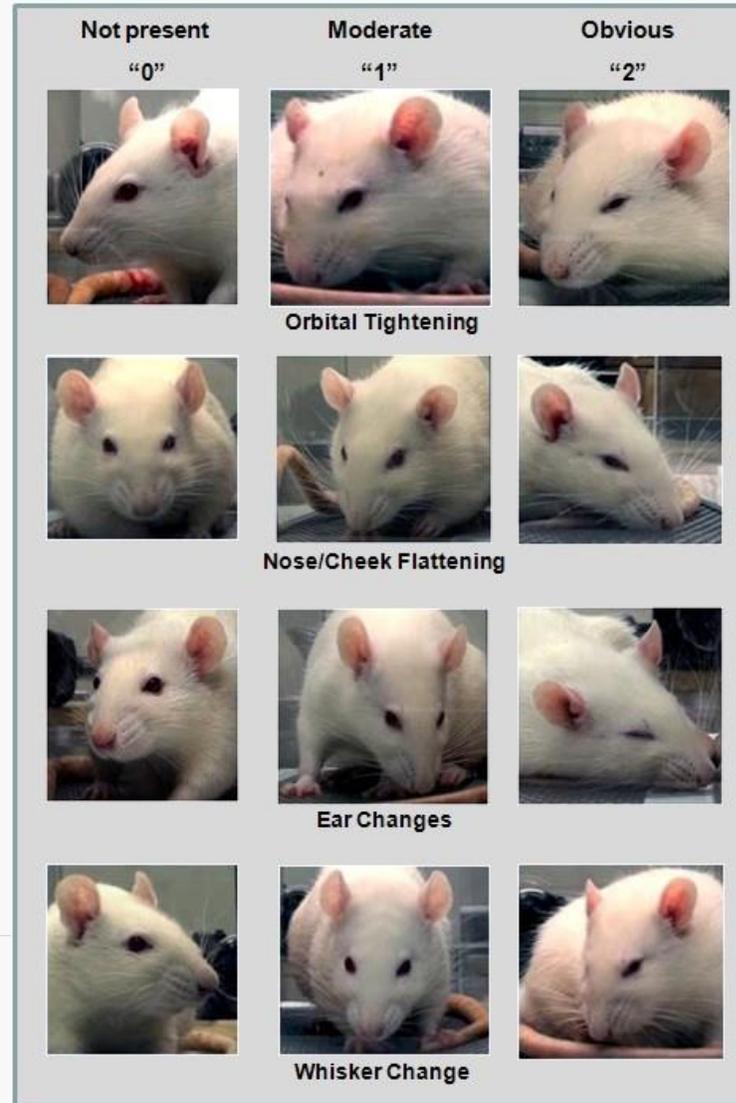
Langford, D.J., Bailey, A.L., Chanda, M.L., Clarke, S.E., Drummond, T.E., Echols, S., Glick, S., Ingrao, J., Klassen-Ross, T., LaCroix-Fralish, M.L., Matsumiya, L., Sorge, R.E., Sotocinal, S.G., Tabaka, J.M., Wong, D., van den Maagdenberg, A.M.J.M., Ferrari, M.D., Craig, K.D., and Mogil, J.S. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. Nature Methods, in press.

<https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Guidelines/MGS%20Manual.pdf>

DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Ratto

- Come il Topo
- Espressione Facciale
- Cromodacriorrea (lacrime rosse)
- Vocalizzazioni?



Sotocinal, S.G., Sorge, R.E., Zaloum, A., Tuttle, A.H., Martin, L.J., Wieskopf, J.S., Mapplebeck, J.C.S., Wei, P., Zhan, S., Zhang, S., McDougall, J.J., King, O.D., and Mogil, J.S. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. Mol. Pain, in press.
<https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Guidelines/RGS%20Manual.pdf>

DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Coniglio

- Ansia
- Vocalizzazioni
- Tendenza a nascondersi
- Aspetto poco curato
- Aggressività → morsi, graffi
- Immobilità (tonica)
- Calo appetito → aggrava il quadro clinico
- Espressione Facciale



Cheek flattening

- Flattening of the cheeks. When 'obviously present', cheeks have a sunken look.
- The face becomes more angular and less rounded

Nostril shape

- Nostrils (nares) are drawn vertically forming a 'V' rather than 'U' shape
- Nose tip is moved down towards the chin



Ear shape and position

- Ears become more tightly folded / curled (more cylindrical) in shape
- Ears rotate from facing towards the source of sound to facing towards the hindquarters
- Ears may be held closer to the back or sides of the body

Orbital tightening

- Closing of the eyelid (narrowing of orbital area)
- A wrinkle may be visible around the eye



Whisker shape and position

- Whiskers are pushed away from the face to 'stand on end'
- Whiskers stiffen and lose their natural, downward curve
- Whiskers increasingly point in the same direction. When 'obviously present', whiskers move downwards

Keating SCJ, Thomas AA, Flecknell PA, Leach MC (2012) Evaluation of EMLA cream for preventing pain during tattooing of rabbits: Changes in physiological, behavioural and facial expression responses. PLOS ONE 7(9): e44437. doi:10.1371/journal.pone.0044437 <https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/RbtGS%20Manual.pdf>

DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Cavia, Criceto e Gerbillo

- Cavia: Fuga/immobilità, vocalizzazioni, anoressia
- Criceto/Gerbillo: aggressività, morsi, piloerezione, aspetto poco curato (*oily fur*)



DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Pesci&Anfibi

Pesci:

Dati su Dolore Acuto - non caratterizzata la reazione a stimoli cronici;

- Intensi movimenti muscolari (reazione a puntura)
- Atteggiamento natatorio anomalo
- Movimenti opercolari più rapidi
- Sfregamento delle aree colpite contro superfici ruvide

Anfibi:

NO segni clinici specifici;
Ipotesi mutuata dalla pratica clinica veterinaria;

- Diminuzione movimenti di fuga
- Diminuzione appetito
- Assenza di Espressioni facciali (?!)

DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Sessione Video



DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Sessione Video



DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Sessione Video

- <https://www.youtube.com/watch?v=P2rQVUy2Phw> (Mouse)



DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Sessione Video

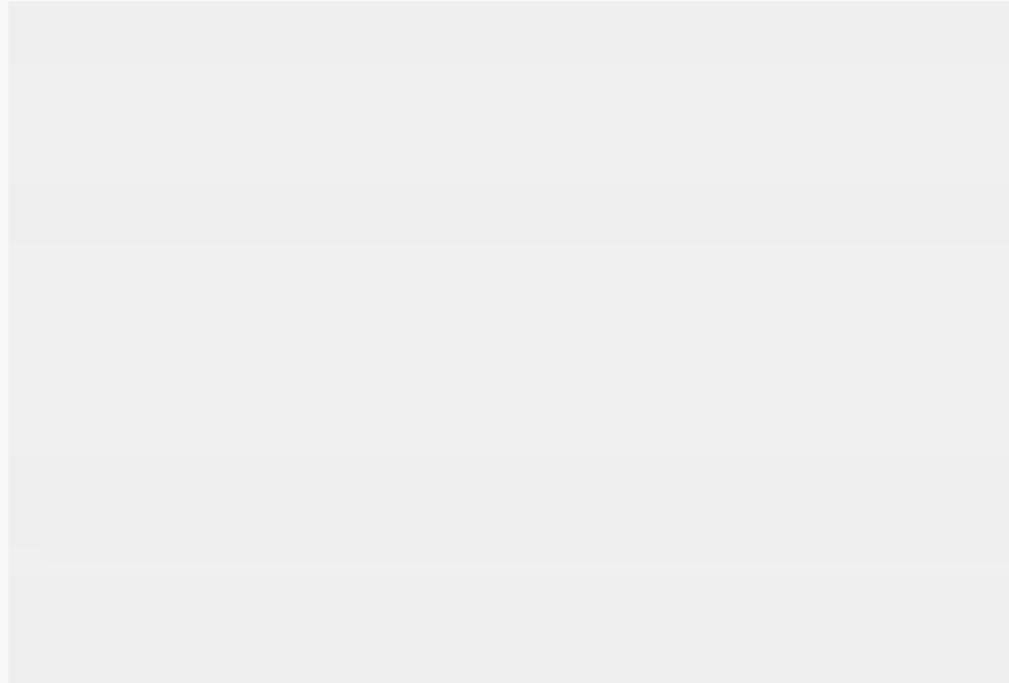
- Writhing (Mouse)



DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Sessione Video

- https://www.youtube.com/watch?v=Ws3QAboXj_Y (Rat)



DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Sessione Video

Pain Assessment
in the Rat

-

Behaviour following Laparotomy
for Bladder Tumour Implant

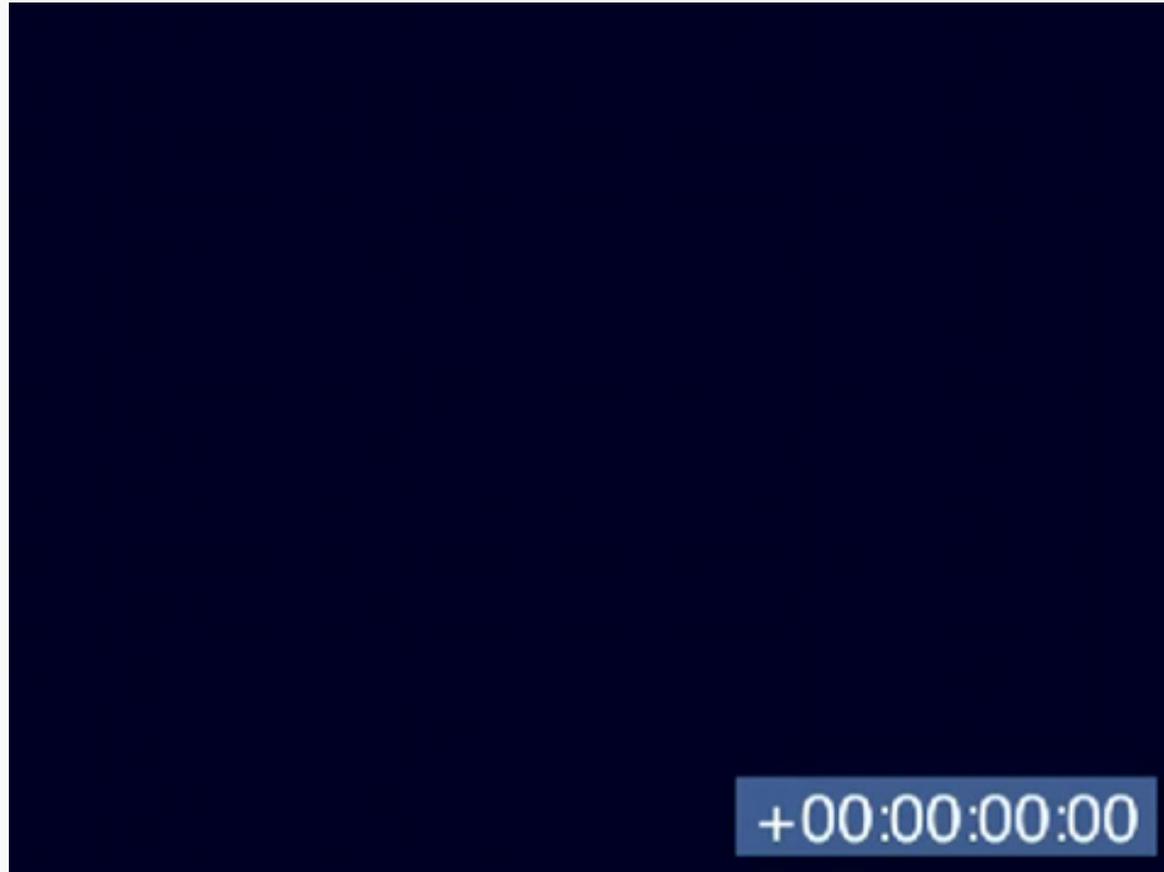
DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Sessione Video

Pain Assessment
in the Rat
-
Instructional Clips

DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Sessione Video



DOLORE, SOFFERENZA&DISTRESS NEGLI ANIMALI DA LABORATORIO

Perché?

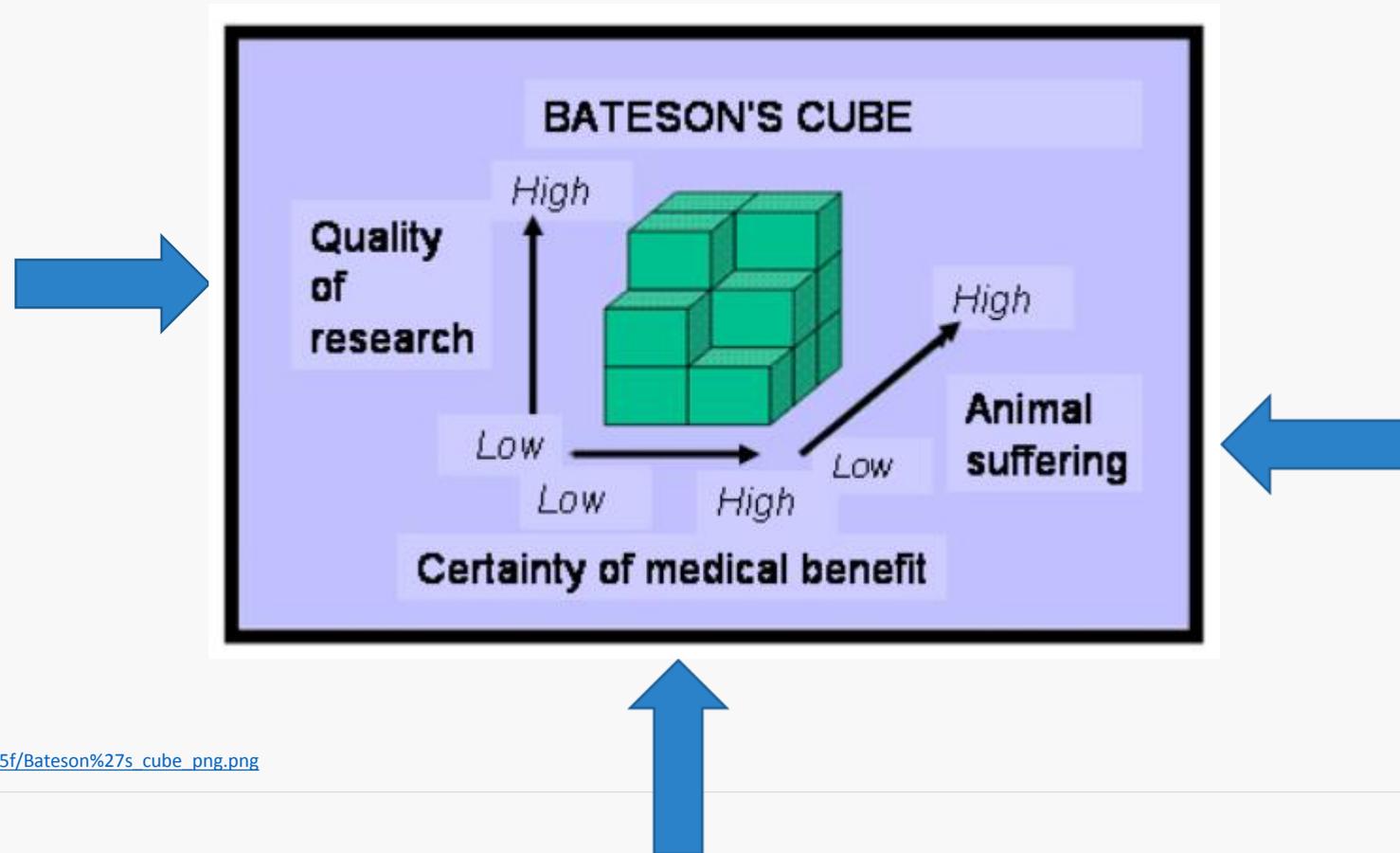
Art. 13 D.Lgs 26/2014

Scelta dei metodi

1. Non sono autorizzabili le procedure che prevedono l'impiego di animali vivi per le quali esistono altri metodi o strategie di sperimentazione, riconosciute dalla legislazione dell'Unione europea, ovvero prevedono metodi vietati dalla normativa vigente nazionale.
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.**
3. Nelle procedure di cui al comma 2, va evitata la morte come punto finale, preferendo punti finali più precoci e umanitari. Qualora la morte come punto finale è inevitabile, la procedura soddisfa le seguenti condizioni:
 - a) comportare la morte del minor numero possibile di animali;
 - b) ridurre al minimo la durata e l'intensità della sofferenza dell'animale, garantendo per quanto possibile una morte senza dolore.

VALUTAZIONE DANNO/BENEFICIO

Era il lontano 1986...



https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5f/Bateson%27s_cube.png

VALUTAZIONE DANNO/BENEFICIO



- dimostrare di essere **consapevoli del danno**;
- fornire una descrizione accurata dell'impatto delle procedure sulle condizioni di benessere dell'animale;
- per linee geneticamente modificate occorre fornire una descrizione accurata del fenotipo noto (o atteso);
- NB: è **più difficile misurare i benefici rispetto ai danni!**

VALUTAZIONE DANNO/BENEFICIO

FELASA Working Party Report 2016

Valutazione del Danno

- Terminologia ed Ambiti più definiti
 - 3Rs
 - Classi di severità
 - Riduzione del livello di sofferenza
 - Punti finali umanitari

Harm Impact on Five Freedoms
Freedom from Pain/Injury
Freedom from Fear/Distress
Freedom from Hunger/Thirst
Ability to express normal behavior
Freedom from Discomfort/appropriate husbandry

Benefit Domains
Social benefits <ul style="list-style-type: none">• Human health• Animal health• Environmental health
Socioeconomic benefits
Scientific benefits
Educational benefits
Safety and efficacy

Valutazione del Beneficio

- Terminologia più vaga
 - Benefici per l'uomo, gli animali, l'ambiente
 - NON tutti i benefici hanno uguale valore (economici, formativi, patologie legate a scorretto stile di vita)

Current concepts of Harm–Benefit Analysis of Animal Experiments – Report from the AALAS–FELASA Working Group on Harm–Benefit Analysis – Part 1 Aurora Brønstad , Christian E Newcomer , Thierry Decelle , Jeffrey I Everitt , Javier Guillen and Kathy Laber. Laboratory Animals 2016, Vol. 50(1S) 1–20 <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0023677216642398>
Recommendations for Addressing Harm–Benefit Analysis and Implementation in Ethical Evaluation – Report from the AALAS–FELASA Working Group on Harm–Benefit Analysis – Part 2 Kathy Laber, Christian E Newcomer, Thierry Decelle, Jeffrey I Everitt, Javier Guillen, Aurora Brønstad. Laboratory Animals 2016, Vol. 50(1S) 21–42 <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0023677216642397>

VALUTAZIONE DANNO/BENEFICIO

FELASA Working Party Report 2016

HARM TABLE

HARM-Freedoms Impacted Pain/Injury: _____ Fear/Distress: _____ Hunger/Thirst: _____ Ability to express normal behavior: _____ Discomfort/Husbandry: _____				
Modulating Factors for HARM	Description	Mitigating Effect	Aggravating Effect	Summary Color
Animal— Species				
Animal— Number				
Animal— Suited to environment				
Animal— Health status				
Experimental— Intensity				
Experimental Duration				
Experimental Cumulative Experience				
Experimental— Endpoint				
Experimental Complication/Distribution Rate				
Experimental Genetic Modulation				
Environmental Housing/Husbandry				
Environmental Personnel competence/experience				

BENEFIT TABLE

Social - Human health: _____ - Animal health: _____ - Environment health: _____ Socioeconomic: _____ Scientific: _____ Educational: _____ Safety and Efficacy: _____		
Modulating Factors for Benefit	Description Why/How/What /When	Summary Color/ Numeric Score
Importance of outcome		
Clarity of objectives		
Translational Potential		
Likelihood of success		
Continuity of recognized scientific efforts		
Quality of Experimental Design		
Innovation Level		
Dissemination of Results		

Current concepts of Harm–Benefit Analysis of Animal Experiments – Report from the AALAS–FELASA Working Group on Harm–Benefit Analysis – Part 1 Aurora Brønstad , Christian E Newcomer , Thierry Decelle , Jeffrey I Everitt , Javier Guillen and Kathy Laber. Laboratory Animals 2016, Vol. 50(1S) 1–20 <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0023677216642398>

Recommendations for Addressing Harm–Benefit Analysis and Implementation in Ethical Evaluation – Report from the AALAS–FELASA Working Group on Harm–Benefit Analysis – Part 2 Kathy Laber, Christian E Newcomer, Thierry Decelle, Jeffrey I Everitt, Javier Guillen, Aurora Brønstad. Laboratory Animals 2016, Vol. 50(1S) 21–42 <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0023677216642397>

VALUTAZIONE DANNO/BENEFICIO

FELASA Working Party Report 2016

*Category:	Category Description:	Color Score:	Plus Score:
Harm/Aggravating Factors	No impact	White	-
Benefit /Strength Factors	High Impact		++++
Harm/Aggravating Factors	Minimal	Pink	+
Benefit /Strength Factors	Moderate		+++
Harm/Aggravating Factors	Mild	Rose	++
Benefit /Strength Factors	Neutral		++
Harm/Aggravating Factors	Moderate to Severe	Red	+++
Benefit /Strength Factors	Minimal		+
Harm/Aggravating Factors	Severe	Crimson	++++
Benefit /Strength Factors	No positive impact		-

Current concepts of Harm–Benefit Analysis of Animal Experiments – Report from the AALAS–FELASA Working Group on Harm–Benefit Analysis – Part 1 Aurora Brønstad , Christian E Newcomer , Thierry Decelle , Jeffrey I Everitt , Javier Guillen and Kathy Laber. Laboratory Animals 2016, Vol. 50(1S) 1–20 <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0023677216642398>

Recommendations for Addressing Harm–Benefit Analysis and Implementation in Ethical Evaluation – Report from the AALAS–FELASA Working Group on Harm–Benefit Analysis – Part 2 Kathy Laber, Christian E Newcomer, Thierry Decelle, Jeffrey I Everitt, Javier Guillen, Aurora Brønstad. Laboratory Animals 2016, Vol. 50(1S) 21–42 <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0023677216642397>

VALUTAZIONE DANNO/BENEFICIO

ISS

Benefici:

- Obiettivo chiaro
- Potenziale traslazionale chiaro
- Beneficiari ultimi sono chiari
- Meno chiari qualità del disegno sperimentale, innovazione, condivisione.
- Altrove in Allegato VI

1) danno-beneficio: un esempio (+)

Benefici: *La perdita di massa muscolare conseguente all'invecchiamento, a lunghi periodi di o ad altre condizioni patologiche determina una progressiva perdita di mobilità che riduce la qualità della vita e ha importanti conseguenze economiche e sociali. Ad esempio, la cachessia neoplastica è una sindrome multifattoriale che spesso complica la gestione dei pazienti oncologici. E' caratterizzata da perdita di peso corporeo, deplezione sia delle proteine del muscolo scheletrico che delle riserve lipidiche, anoressia e perturbazioni dell'omeostasi metabolica. La cachessia è causa prima di circa il 25% delle morti per cancro, complica la gestione dei pazienti oncologici (interferisce con le terapie) ed è ampiamente riconosciuta come uno dei maggiori problemi in oncologia clinica. Le alterazioni metaboliche proprie della cachessia neoplastica sono un evento precoce, con un forte impatto sullo stato di benessere del paziente, e si associa a deplezione delle proteine del muscolo scheletrico. Questo progetto mira a individuare strumenti molecolari e/o farmacologici che permettano di bloccare/rallentare la perdita di massa e di forza muscolare che avviene naturalmente durante la vecchiaia o come conseguenza di alcune gravi patologie acquisite e/o genetiche.*

Danni: *In tutti i gruppi sperimentali sono stati descritti i danni potenziali agli animal che verranno monitorati quotidianamente nella fase postchirurgica mediante apposite scale di valutazione per il riconoscimento di stati di dolore dell'animale e degli humane endpoints. Su un totale di 11 procedure sperimentali che andremo a descrivere al punto 21, 3 presentano procedure classificabili come "grave" in base all'allegato 7 del D.Lgs.26/2014.*

Danni:

- Identificati (descritti altrove in Allegato VI)
- Misure per mitigare il livello di sofferenza
- Distribution Rate!

Laura Ricceri, Flavia Chiarotti, Augusto Vitale e Nadia Francia. Criteri e contenuti nella valutazione scientifica dei progetti di ricerca (ai sensi del D.Lgs 26/2014). Istituto Superiore di Sanità.

CONCLUSIONI

Imparare a riconoscere correttamente segni di Dolore, Sofferenza e Distress è fondamentale per:

- **Assicurare il benessere animale**
- **Attendibilità del dato sperimentale**
- Effettuare corretta valutazione **Danno/Beneficio**
 - Obiettivo: identificare quali sono i valori di sofferenza oltre i quali il beneficio non vale più il danno, indicando un *drop-out value* oltre il quale non è accettabile la continuazione dell'esperimento.
 - Humane Endpoint → in fase di stesura allegato VI
 - Severità attesa vs Severità attuale → valutazione retrospettiva

CONTACT US

Sara Fuochi

DVM

Address:

**Via indipendenza 11
23885 Calco**

Website:

www.criver.com

Email:

sara.fuochi@crl.com

Phone:

039 50 99 15