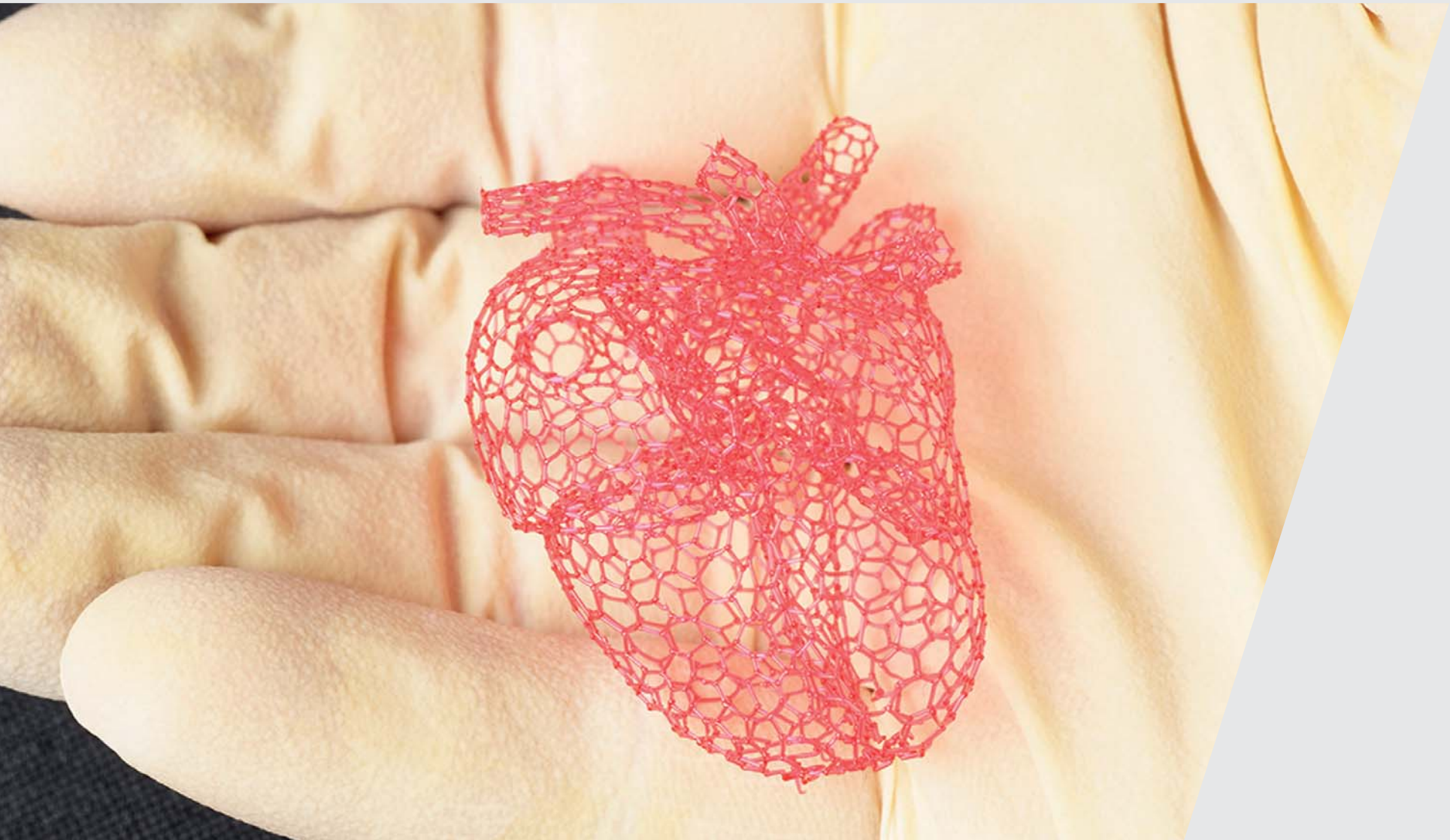




Sviluppo e divulgazione dei metodi *non animal based*



di **SILVIA DOTTI**

Centro di Referenza per i Metodi Alternativi, Benessere e Cura degli Animali da Laboratorio - IZSLER

Il Centro di Referenza per i Metodi Alternativi, Benessere e Cura degli Animali da Laboratorio è stato istituito con decreto Ministeriale nel 2011 (DM del 20.04.2011) ed ha sede a Brescia presso l'Istituto Zoonofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Il Centro di Referenza nasce dall'attività consolidata negli anni presso l'Istituto ed, in particolar modo, presso il Laboratorio Colture Cellulari, relativa all'impiego delle metodiche *in vitro* legate proprio all'utilizzo di tale supporto biologico sia come metodo diagnostico sia come mezzo di produzione nell'ambito del farmaco e della medicina rigenerativa.

Negli ultimi anni, la tematica relativa ai metodi alternativi o, meglio, *non animal based*, ha avuto grande risonanza sia in ambito scientifico sia nell'opinione pubblica; questo in quanto l'impiego di animali da laboratorio per la tutela della salute umana ed animale, rappresenta un punto critico e dibattuto dal

punto di vista etico e scientifico.

L'argomento non può essere affrontato in un'unica ottica, ma vi sono differenti sfaccettature che devono necessariamente essere prese in considerazione, al fine di garantire una visione totale e scientificamente valida di come questi metodi *non animal based* possano essere impiegati con successo per andare a sostituire l'utilizzo degli animali.

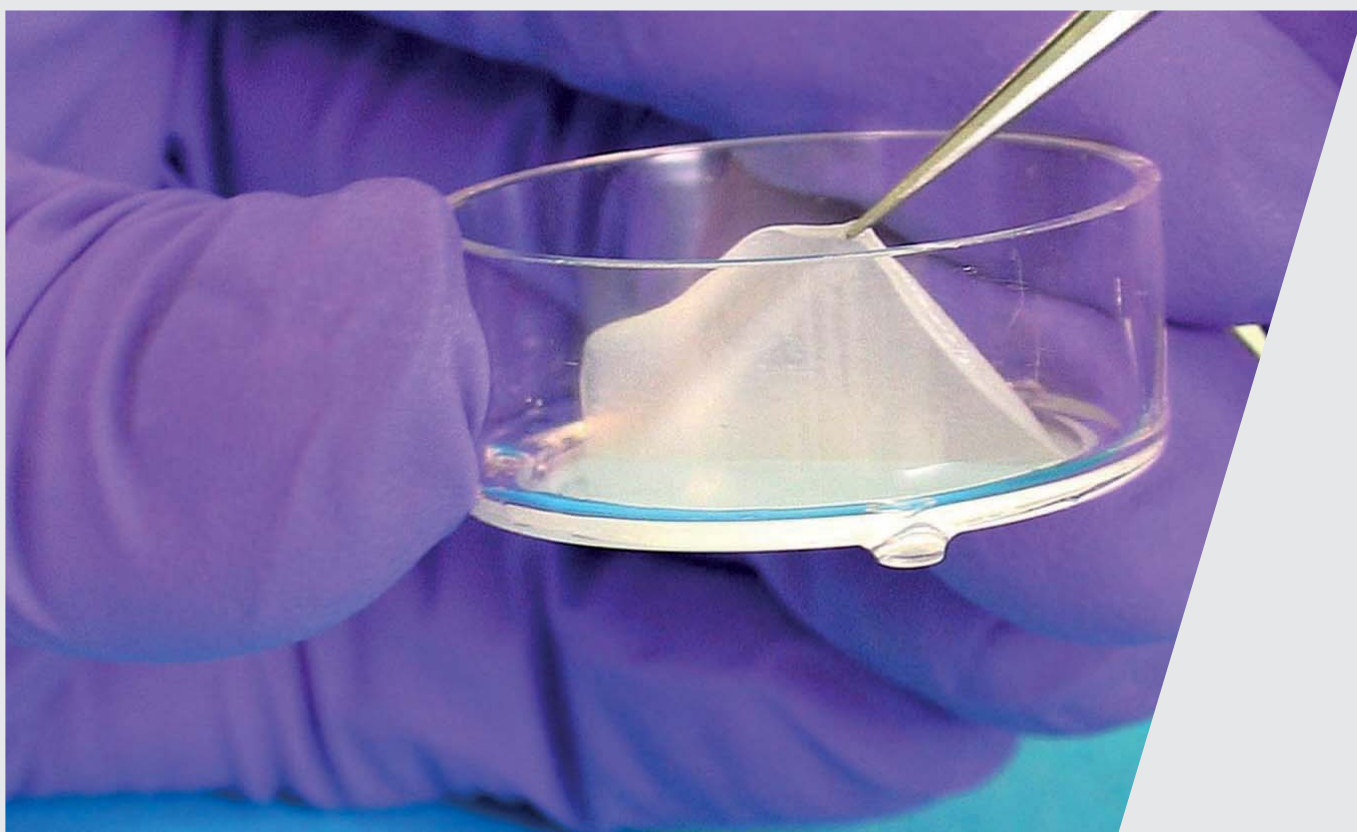
Il Centro di Referenza ha svolto e svolge la propria attività contribuendo in diversi modi allo sviluppo e divulgazione dei metodi alternativi.

In primo luogo rappresenta, in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità, il *contact point* italiano con il Centro Europeo di Validazione dei Metodi Alternativi (ECVAM), organo competente internazionale preposto non solo alla validazione dei metodi *non animal based*, ma anche all'armonizzazione della normativa tra i diversi Stati membri ed alla divulgazione e formazione degli operatori del settore. A tale proposito, è importante

sottolineare che, oltre ad essere componente attivo del gruppo PARERE, costituito da rappresentanti dei Paesi membri, il quale fornisce supporto ad ECVAM per la valutazione di metodi alternativi, stesura di linee guida inerenti gli stessi, etc; il Centro fa parte anche di EU-NETVAL, circuito inter-laboratorio europeo che segue ed opera in modo pratico la validazione dei metodi *non animal based*. Negli ultimi anni, il Centro è stato coinvolto direttamente nella validazione di due test inerenti la valutazione di sostanze chimiche potenzialmente in grado di determinare disfunzioni endocrine. Tale percorso è, attualmente, arrivato al termine della fase 1 e nel 2021 si prevede di arrivare alla fine della fase 2 che, se confermerà i dati preliminari, potrebbe portare alla messa a punto dei due metodi ed il loro inserimento tra quelli in grado di sostituire l'utilizzo degli animali nella valutazione di sostanze chimiche potenzialmente interferenti con il sistema endocrino.

Il Centro fornisce un supporto costante al Ministero della Salute in merito all'emissione di pareri relativi all'applicazione di metodi alternativi in differenti ambiti di lavoro (diagnostica e ricerca) e, proprio grazie a fondi stanziati per la ricerca dal Ministero, è stato possibile, a partire dal 2019, mettere a punto ed applicare la metodica del LAL test per la valutazione dei controlli relativi ai vaccini stabulogeni. Nello specifico, vista la necessità di sostituire il test della tossicità anormale eseguita su modello murino, il Centro, in collaborazione con il Laboratorio Produzione Vaccini e Reagenti, della sede di Brescia, ha iniziato ad eseguire il LAL test al fine di sostituire con quest'ultimo la prova su topo. Attualmente, è stato possibile analizzare un numero di circa 400 campioni, che ha consentito una valutazione in merito alle modalità di allestimento del materiale in esame (diluizioni, possibili interferenze, etc.) al fine di ottenere un risultato che consenta una corretta interpretazione del dato ottenuto.

Il laboratorio ha ampliato le conoscenze relative alle metodiche *in vitro*, inserendo tra le proprie finalità anche l'aspetto inerente il benessere degli animali da laboratorio. Questo argomento è relativo al *refinement* degli animali, in quanto una valutazione sistematica del profilo sanitario degli stessi consente un miglioramento, non solo delle informazioni cliniche, ma anche delle modalità di lavoro legate allo stabulario. Condizioni stabili degli animali consentono di ottenere sperimentazioni più corrette nella rielaborazione dei dati: soggetti asintomatici che albergano agenti patogeni potenzialmente interferenti con le modalità di conduzione di uno studio, possono fornire dati non esaustivi a causa, ad esempio, di una alterazione del sistema immunitario, oppure endocrino, etc. Per questo motivo, è importante monitorare in modo costante lo stato sanitario dei soggetti. Tale operazione può essere condotta con metodiche di biologia



«L'evoluzione continua delle biotecnologie, legate da una parte alla diagnostica e dall'altra alla ricerca, fa in modo che le applicazioni *non animal based* in laboratorio siano sempre più fattibili e utili in diversi ambiti scientifici»

molecolare, che, in molti casi, non necessitano di prelevare campioni dagli animali, ma possono essere eseguite su materiale ambientale, ad esempio: segatura, filtri HEPA, feci presenti nella gabbie. In questo modo, non è necessaria la manipolazione degli animali, con conseguente diminuzione di stress dovuto a tali operazioni. Negli ultimi due anni, il Centro ha rivolto una particolare attenzione allo studio delle applicazioni del sistema *zebrafish* (*danio rerio*) come metodo alternativo, nella sua forma larvale fino al quinto giorno post fecondazione. Infatti, come previsto dalla normativa vigente, le forme di vita che non sono in grado di nutrirsi in modo autonomo come accade per le larve sopra menzionate, vengono considerate sperimentazione *in vitro*. Tale approccio consente di utilizzare questo supporto biologico per differenti studi

legati alla tossicologia, farmacologia ed ecotossicità. Un ulteriore importante impegno perseguito dal Centro è rappresentato dalla divulgazione relativa ai metodi alternativi legati alla sperimentazione animale e dalla formazione degli operatori del settore dal punto di vista teorico/pratico.

Negli anni questa attività ha permesso al Centro di collaborare con diverse società scientifiche e relatori afferenti a vari istituti di ricerca; ciò ha consentito la condivisione di conoscenze ed *expertise* che hanno, non solo, permesso la divulgazione di tali argomenti, ma anche la stretta collaborazione nell'ambito della ricerca con la partecipazione a progetti dedicati ai metodi alternativi.

Il coinvolgimento in studi basati sull'impiego delle colture cellulari a partire dal 2D fino ad arrivare al nuovo concetto applicativo di 3D, ha permesso di ampliare ed aggiornare i metodi *in vitro*, con particolare attenzione alla tossicità di composti di varia natura sia nella ricerca di base sia in quella applicata.

In questo contesto, come è facile intuire, la collaborazione tra le diverse figure professionali è di fondamentale importanza. Nello specifico, è necessario un confronto costante tra le differenti *expertise* al fine di ottimizzare i possibili ambiti della ricerca in cui applicare queste tipologie di metodi. Il medico veterinario rientra in questo ambito sia come benessere degli animali ancora ampiamente impiegati in sperimentazione, sia come figura in grado di agire in modo importante nell'ambito del *refinement* e della riduzione del numero degli animali utilizzati e nella scelta del modello sperimentale.

In conclusione, è importante sottolineare che i metodi alternativi non coinvolgono unicamente il tema legato alle metodiche *in vitro*, ma riguardano anche altri aspetti altrettanto cruciali, quali la valutazione del benessere degli animali da laboratorio, la divulgazione/formazione alle diverse figure professionali coinvolte nella ricerca scientifica ed il continuo confronto con il panorama internazionale con uno sguardo sia alla ricerca sia al regolatorio.

L'evoluzione continua delle biotecnologie, legate da una parte alla diagnostica e dall'altra alla ricerca, fa in modo che le applicazioni *non animal based* in laboratorio siano sempre più fattibili e utili in diversi ambiti scientifici.

Per questo motivo, è basilare comprendere dove realmente sia proficuo spendere energie e fondi per sviluppare e/o implementare i già consistenti interventi atti a percorrere la strada del principio delle 3R.

