

Protocollo di valutazione del progetto

Il progetto viene valutato da revisori indipendenti sotto due aspetti:

1: valutazione scientifica (40 punti)

TITOLO DEL PROGETTO:
RESPONSABILE:
DGSAF/XXXXXX
PROT SSA/XXXX/2015 (I.S.S.-B.C.N. BCN XX/XX/2015-0000XXX)

Valutazione Scientifica (40 punti)	
a) scopi del progetto che giustificano l'uso dell'animale;	15 punti
c) analisi dei danni e dei benefici derivanti dal progetto;	5 punti
e) effettiva necessità della ricerca in quanto non costituisce una inutile duplicazione di ricerche precedenti;	5 punti
f) giustificazione del progetto unitamente alle procedure ivi previste da un punto di vista scientifico o educativo o, comunque, previsto per legge;	5 punti
h) motivazioni poste alla base dell'utilizzo di una determinata specie, allevata o meno per essere impiegata nelle procedure;	5 punti
i) minor numero di animali per il raggiungimento delle finalità del progetto;	5 punti
TOTALE SEZIONE VALUTAZIONE SCIENTIFICA	
Commenti e limitazioni	

2) valutazione tecnica (60 punti)

Valutazione tecnica (60 punti)	Presente	Punteggio
b) presenza del parere motivato di cui all'articolo 26, comma 1, lettera d);		15
d) preventiva valutazione circa lo svolgimento delle procedure nelle condizioni più umanitarie e più rispettose dell'ambiente possibili;		5
g) conformità a quanto previsto dal presente decreto relativamente alla competenza professionale del personale designato a condurre le procedure;		10
l) tutte le possibili precauzioni assunte per prevenire o ridurre al minimo il dolore, la sofferenza e il distress nelle procedure		5
m) rispetto di quanto disposto dall'articolo 14 (anestesia);		2
n) motivazioni poste alla base della scelta delle vie di somministrazione dei preparati;		2
o) utilizzo di metodi adeguati di eutanasia in conformità con l'articolo 6; 3 punti		3
p) preventiva valutazione sulla gravità delle procedure, nonché di una classificazione delle stesse secondo i criteri di cui all'articolo 15 e all'Allegato VII del presente decreto; (il giudizio è sulla corretta valutazione di questo punto)		5

q) necessità di eseguire o meno una valutazione retrospettiva del progetto di cui all'articolo 32; (il giudizio è sulla corretta valutazione di questo punto)		5
r) presenza di personale con competenze specialistiche nei seguenti ambiti:		
1) settori di applicazione scientifica in cui gli animali saranno utilizzati, con particolare riguardo alla realizzazione della sostituzione, della riduzione e del perfezionamento;		2
2) progettazione sperimentale e, se del caso, valutazione dei dati statistici;		2
3) pratica veterinaria, nelle scienze degli animali da laboratorio o, se del caso, pratica veterinaria applicata alla fauna selvatica;		2
4) allevamento e cura degli animali in relazione alle specie che si intende utilizzare		2

La valutazione tecnica è quella su cui si concentra maggiormente l'analisi dei revisori, e quindi è quella che va curata di più. Si analizzino bene i punti elencati nella seconda tabella.

Le 3 principali criticità riscontrate nella revisione scientifica (le 3D)

- 1) analisi **d**anni-benefici
- 2) **d**isegno sperimentale
- 3) **d**imensionamento

1) analisi **d**anni-benefici

Il rapporto danno-beneficio è uno dei capitoli più difficili da scrivere ma **di importanza decisiva nella valutazione complessiva**. I Revisori valutano il rapporto Sofferenza animale/Qualità della ricerca e talvolta aggiungono una terza dimensione (certezza del beneficio) se si propone una ricaduta terapeutica. L'ottica è quella che si ricava dai numerosi articoli che si trovano con una ricerca su *Ethical scores for animal experiments*. E' necessario dimostrare di essere consapevoli del danno, fornendo una descrizione accurata dell'impatto delle procedure sulle condizioni di benessere dell'animale. Occorre indicare quali sono i valori di sofferenza oltre i quali il beneficio non vale più il danno, indicando un *drop-out value* - es: il 15% di riduzione di peso è considerato un valore limite, oltre il quale non è accettabile la continuazione dell'esperimento, se non in casi del tutto eccezionali, ecc...

- E' importante dimostrare di essere **consapevoli del danno**, fornendo una descrizione accurata dell'impatto delle procedure sulle condizioni di benessere dell'animale. Nel caso di linee geneticamente modificate occorre fornire una descrizione accurata del fenotipo noto.
- Ricordare che è **più difficile misurare i benefici rispetto ai danni**. Anche nei progetti europei si considerano fattori come grado di sofferenza, certezza di beneficio bio-medico,

qualità della ricerca ecc.. In questo contesto è utile riprendere il “vecchio” cubo di Bateson del 1986 - per referenze: https://en.wikipedia.org/wiki/Bateson%27s_cube.

16 2 General issues

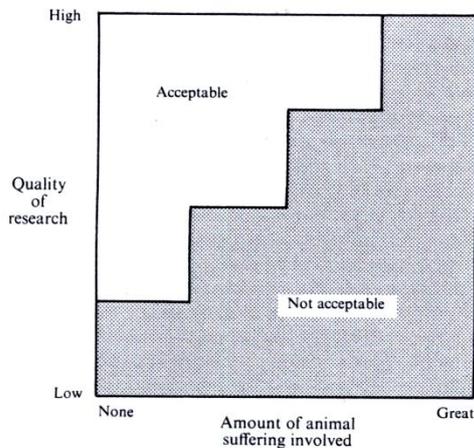


Fig. 2.1. A representation of one way in which the amount of animal suffering involved in a proposed research project can be balanced against the quality of the research. The hatched area represents research that should not be done - either because it involves unacceptable suffering, or because it is of low quality, or both. As shown here, both research quality and suffering have been rated on a four-point scale. 'Quality' is a multidimensional variable which encompasses both scientific excellence and potential practical benefits (see text).

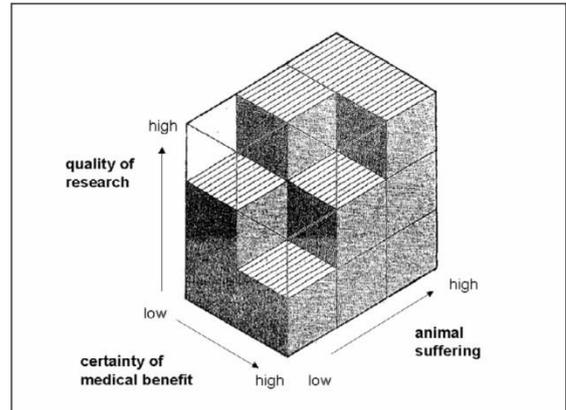


Fig. 4: Graph according to Bateson (1986). Quality of research, certainty of benefit and animal suffering should be in a balanced relation. When a research proposal falls into the opaque part of the cube, the experimental work should not be done

3rd dimension: certainty of medical benefit

Di seguito due esempi sbagliati e due esempi corretti di analisi del rapporto danni-benefici mostrati dai revisori - le sottolineature sono dei revisori stessi

Due esempi sbagliati di analisi dei rapporti danni-benefici:

Primo esempio:

d. Rapporto danno/beneficio:

Il sacrificio degli animali utilizzati in questi esperimenti porterà un importante beneficio nel campo dello studio e della ricerca dell'anoressia nervosa. Infatti, i risultati ottenuti da questo progetto aumenteranno la conoscenza dei meccanismi patogenetici dell'anoressia nervosa, ancora largamente sconosciuti, e porteranno all'individuazione di nuovi bersagli farmacologici per prevenire o ridurre la gravità della patologia stessa. Tali studi valuteranno anche se un approccio di tipo non farmacologico, come l'utilizzo di un ambiente arricchito, possa prevenire o ridurre la gravità della patologia stessa.

(Questo tipo di considerazioni è quello che normalmente si fa: danno subito dall'animale vs. il possibile beneficio sull'uomo - posto in questi termini il rapporto è sempre zero, qualunque sia il livello di sofferenza imposto all'animale - nota OBA UniFE)

Secondo esempio:

“Activity based anorexia (ABA) is an animal model of AN in which rats are allowed free access to running wheels (RW) but restricted to 2 h food access per day. Rats exposed to this way display symptoms similar to those seen in anorexic women. These include **paradoxical hyperactivity, hypophagia, extreme weight loss and estrous cycle disruption**. Conversely, rodents given either restricted food access or running wheels maintain their body weight.

Pre-weighed quantity of food pellets (30 g) was placed daily for restricted period of only 2 h and thereafter food was removed from the cage hopper. Food intake was monitored (g) manually by weighing the leftover food immediately after 2 h. Animals were maintained on this restricted scheduled feeding between 1700–1900 h for 10 days. Body weight of all animals was measured daily just prior to drug administration. For ethical reasons, **it was decided that rats were to be removed from the experiment when they lost more than 25% of their initial body weight (drop-out value)**”.

(in questo caso l'errore era in un drop-out value eccessivo: 25%, contro un valore limite accettato del 15% - nota OBA UniFE)

Due esempi corretti di analisi del rapporto danno-beneficio:

Primo esempio:

Benefici: *La perdita di massa muscolare conseguente all'invecchiamento, a lunghi periodi di o ad altre condizioni patologiche (cachessia neoplastica, sepsi, AIDS, diabete, insufficienza renale cronica, insufficienza cardiaca cronica, ustioni) 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, in particolare il contemporaneo aumento sia del metabolismo basale che del dispendio energetico portano ad un bilancio energetico negativo. Questo ha un forte impatto sullo stato di benessere del paziente, e si associa a deplezione delle proteine del muscolo scheletrico. Questo progetto consentirà di 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 descritti sono compresi tutti i danni potenziali agli animali.* *L'esperienza pluridecennale del nostro team ci ha consentito di acquisire nozioni scientifiche in merito al 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,*

solo 3 presentano procedure classificabili come “grave” in base all’allegato 7 del D.Lgs.26/2014. Le pratiche da noi utilizzate prevedono procedure perfettamente acquisite nei corsi degli anni dai membri del nostro team.

Secondo esempio

Gli animali verranno seguiti per tutta la durata della sperimentazione. Verrà utilizzata l’anestesia in tutti i gruppi che la prevedono. Non sono attesi stadi di sofferenza oltre quelli descritti al punto 21. Inoltre gli animali saranno pesati prima e dopo la sperimentazione. Nella procedura X porremo particolare attenzione alla pesata prima dell’inoculo tumorale e gli animali verranno pesati giornalmente in modo tale da riconoscere immediatamente l’endpoint del gruppo (15% di diminuzione di peso). Nella procedura Y al fine di evitare difficoltà a procacciarsi il cibo dalla griglia, verrà posto del cibo bagnato sulla lettiera per il primo giorno. La procedura Z (treadmill) prevede la costante presenza di un ricercatore per tutta la durata della sperimentazione trattandosi di un’osservazione continua comportamentale.

2) disegno sperimentale

Allegato VI 15. La durata del progetto di ricerca può essere **al massimo** (ma non obbligatoriamente) 60 mesi;

Pianificare 5 anni di esperimenti può essere complesso: potrebbe essere conveniente spezzare la sperimentazione in un 2 + 3 o in 3 + 2. Così facendo spesso i numeri possono diventare più realistici in quanto si eliminano opzioni (e.g. trattamenti, dosi) che si sono rivelate non utili;

- Il revisore fa “anche” i conti dei gruppi sperimentali per ogni esperimento previsto con relativa numerosità - se il disegno sperimentale non è chiaro, diventa impossibile valutare la congruità della richiesta.
- Il disegno sperimentale ha anche a che vedere con la **R** di Riduzione del numero di soggetti (e.g. campioni appaiati quando possibile invece di campioni indipendenti)
- Quando possibile mostrare tabelle

3) dimensionamento

USARE LA POWER ANALYSIS - **Si insiste molto su questo**, perché dimostra che da parte del ricercatore si pone una grande attenzione nella ottimizzazione del numero di animali usati.

Come fare la power analysis?

G*Power (<http://www.psych.uni-duesseldorf.de/abteilungen/aap/gpower3/>)

è un software gratuito per il dimensionamento del campione e l’analisi di potenza

La power analysis si basa sui seguenti parametri:

α (il livello di significatività accettato per rifiutare l'ipotesi nulla)

$1-\beta$ (la potenza del test, cioè la probabilità di evidenziare una differenza significativa)

δ (la minima differenza che si vuole essere in grado di evidenziare tra i gruppi a confronto, perché clinicamente/biologicamente rilevante)

σ (la variabilità delle misure che si confrontano)

Il punto da tenere presente è che ***i Revisori vogliono essere messi in condizione di poter rifare i calcoli per verificare l'esattezza del numero di animali di cui si prevede l'uso.***

Occorre pertanto non indicare genericamente che si è fatto ricorso alla Power Analysis, ma indicare anche i valori di α , β , δ , σ usati. Non commettete l'errore di pensare che "tanto queste verifiche non le faranno mai".

(L'OBA UniFE organizzerà un seminario sull'uso di questo strumento)

Altro strumento di lavoro consigliato nella preparazione del progetto: le ARRIVE GUIDELINES

ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) guidelines are intended to improve the reporting of research using animals – maximising information published and minimising unnecessary studies.

The ARRIVE guidelines, originally published in [PLOS Biology](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001912), were developed in consultation with the scientific community as part of an NC3Rs initiative to improve the standard of reporting of research using animals.

<https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>

Raccomandazioni ARRIVE per il dimensionamento del campione:

- a. Specify the total number of animals used in each experiment, and the number of animals in each experimental group.
- b. Explain how the number of animals was arrived at. Provide details of any sample size calculation used.
- c. Indicate the number of independent replications of each experiment, if relevant.

Ulteriori note nella scrittura del progetto

Allegato VI

Punto 9 (Elenco del Personale):

- Il Ruolo non è la qualifica (che va nella casella Titolo di studio o Qualifica), ma cosa si fa nel progetto.

- E' pericoloso non mettere nulla nella casella Formazione per alcune persone, a meno che il Ruolo non sia solo quello di ideatore dell'esperimento

Punto 18 (Descrizione dei fini):

- E' ammessa una sola scelta – assicurarsi che sia uguale a quella espressa nell'allegato IX

Punto 26 (Valutazione del livello di sofferenza)

E' uno dei punti su cui maggiormente si concentrano gli errori di valutazione: quelli mostrati nella tabella che segue sono dati relativi alla analisi di 1134 richieste.

Si osservi in particolare che *tutte* le stime della sofferenza indicate come *moderate* sono state valutate *gravi* dai referee.

Stima indicata	<i>nr.</i>	<i>%</i>	<i>Autorizzato</i>	<i>nr.</i>	<i>%</i>	Errore
Lieve	162	14,2%		247	21,8%	49,2%*
			Moderato	160	14%	
			Grave	84	7,4%	
			Non risveglio	3	0,2%	
Moderato	241	21,2%		246	21,8%	49,2%*
			Grave	246	21,8%	
Non risveglio	73	6,4%		8	0,8%	1,6%*
			Lieve	2	0,17%	
			Moderato	2	0,17%	
			Grave	4	0,36%	
Grave	157	13,8%				
Totale	633	55,6%	Totale	501		44,4%

Nella valutazione del dolore occorre essere molto specifici: i referee raccomandano di inserire una tabella con indicatori quantitativi delle varie condizioni di stress/dolore, indicando il valore numerico del punteggio complessivo raggiunto il quale è prevista la soppressione caritatevole dell'animale. Non usare indicazioni generiche del tipo " quando, dall'analisi del comportamento, vediamo che l'animale sta male procediamo alla soppressione ecc.." ma dire esattamente a quale punteggio della scala di dolore proposta si interviene con l'analgesia, con l'interruzione dell'esperimento o con la soppressione.