



Ministero della Salute  
Direzione Generale della Sanità Animale e dei Farmaci Veterinari  
Ufficio II

## **RICERCA CORRENTE 2019**

### **Istituti Zooprofilattici Sperimentali**

#### **Proposta di progetto di ricerca**

1. Istituto	Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
2. Codice della ricerca	
3. Titolo della ricerca	Valutazione dello stato sanitario di ratti e Zebrafish nell'ottica del <i>Refinement</i> e della <i>Reduction</i>
4. Area tematica	SANITA' ANIMALE
5. Linea di ricerca	SA 1.1 "Studio e messa a punto di nuovi protocolli e strumenti diagnostici per migliorare i sistemi di sorveglianza sulle malattie infettive o sulle patologie di interesse della medicina veterinaria"
6. Responsabile scientifico e relativi recapiti	Villa Riccardo Dirigente Biologo struttura di riferimento: Reparto Produzione e Controllo Materiale Biologico riccardo.villa@izsler.it 030 – 2290 248

# ABSTRACT

(Max 4.500 caratteri spazi inclusi, Times new Roman 12)

## 1. Razionale (inquadramento della tematica /conoscenze disponibili sull'argomento)

La tutela del benessere e la cura degli animali da esperimento sono due capisaldi nell'ambito della sorveglianza sanitaria negli stabulari che, se attuata attraverso specifici programmi di monitoraggio, garantisce condizioni di salute ottimali, affidabilità e riproducibilità dei risultati sperimentali. Lo sviluppo di metodologie molecolari e sierologiche per la tutela della salute negli stabulari riveste, oggi, un ruolo chiave, nell'ottica del principio delle 3Rs. Infatti, l'attuazione di un programma di sorveglianza microbiologica, si inserisce sia nel concetto di *Refinement*, in quanto attraverso la realizzazione di uno screening sanitario degli agenti patogeni (virali, batterici e fungini), è possibile ottenere un miglioramento delle condizioni di salute degli animali e dell'ambiente, sia in quello di *Reduction*. Dalla bibliografia è noto che l'analisi su campioni ambientali (ad es. polvere, acqua o segatura) consente di ottenere risultati sovrapponibili a quelli effettuati su campioni biologici, con lo scopo di ridurre il numero di animali sentinella.

## 2. Scopo del lavoro/ Pertinenza strategica della proposta

Il progetto ha come scopo lo sviluppo di un dettagliato programma di monitoraggio sanitario, basato su tecniche di PCR quantitativa (qPCR) e/o ELISA indiretta, per la verifica dello stato sanitario di ratto e Zebrafish. Inoltre, lo studio si pone come obiettivo la riduzione del numero di animali sentinella.

## 3. Originalità della proposta

La messa a punto di un piano di sorveglianza sanitaria su campioni biologici di ratto e Zebrafish, nonché su materiale ambientale proveniente dagli alloggiamenti degli animali, avrebbe un impatto importante non solo sulla generazione di dati sperimentali di qualità, ma anche sulla riduzione del numero di animali da sacrificare e sul mantenimento di un loro appropriato stato di salute.

## 4. Metodologia applicata

I campioni verranno monitorati a tempi stabiliti. Campioni di DNA e/o RNA verranno estratti attraverso kit appositi e con un estrattore automatico. L'esistenza di protocolli validati già disponibili in letteratura sarà verificata al fine di allestire le reazioni di PCR e, laddove questi non fossero disponibili, verrà effettuata un'indagine in banche dati per identificare le sequenze genomiche di interesse, utili per il disegno di primer e sonde specifici. I saggi immunoenzimatici per l'ELISA indiretta saranno condotti con l'utilizzo di kit commerciali. Da ultimo, sarà effettuata una lettura spettrofotometrica e i risultati verranno analizzati attraverso software statistici.

## 5. Obiettivi prefissati

L'obiettivo principale è la messa a punto di un programma di monitoraggio sanitario, attraverso lo sviluppo di protocolli di biologia molecolare e sierologici per l'analisi di campioni ambientali e biologici di ratto e Zebrafish, con lo scopo di fornire supporto ai ricercatori nell'esecuzione delle attività sperimentali, ridurre il numero di animali sentinella, garantire il benessere animale per tutta la durata della stabulazione e infine assicurare condizioni ambientali e sanitarie il più possibile controllate.

## 6. Risultati attesi

- Allestire un programma dettagliato di sorveglianza sanitaria per ratto e Zebrafish, valutando la frequenza di monitoraggio e i microrganismi patogeni da monitorare,

- Sviluppare tecniche di estrazione di acidi nucleici partendo da materiale di origine ambientale,
- Individuare primer specifici per l'amplificazione in qPCR,
- Valutare l'efficacia di kit commerciali per la realizzazione dei test di ELISA indiretta.

#### 7. Possibilità di trasferimento dei risultati

I risultati conseguiti saranno resi disponibili tramite convegni nazionali e internazionali e pubblicazioni di articoli su riviste scientifiche.

#### 8. Eventuale coinvolgimento dei Centri di Referenza Nazionale competenti per materia

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

#### 9. Bibliografia di riferimento essenziale

[1] M Mahler et al., (2014) "FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units". *Laboratory Animals* 48(3) 178-192 [2] University of Oregon. Zebrafish International Resource Center, Animal Health Report January 2019. [https://zebrafish.org/wiki/health/health\\_reports/start](https://zebrafish.org/wiki/health/health_reports/start) [3] Buxton et al., 2018. "Seasonal variation in environmental DNA detection in sediment and water samples". *PLOS ONE* | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191737>

