



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA E CHIRURGIA

Via Gramsci, 14 - 43126 Parma

Tel: +39 0521 033184 fax: +39 0521 033185

e-mail: amministrazione.dimec@unipr.it - PEC: DipMedicina@pec.unipr.it

Al Ministero della Salute
Direzione Generale della Sanità Animale e
dei Farmaci Veterinari
Sede Centrale
Viale Giorgio Ribotta, 5
00144 - Roma

07 Settembre 2020

OGGETTO: Terza relazione semestrale sulle condizioni di stress dei macachi e misure intraprese per limitare gli effetti avversi – notifica all'Ufficio 6 DGSAF.

In riferimento al progetto "Meccanismi anatomo-fisiologici soggiacenti il recupero della consapevolezza visiva nella scimmia con cecità corticale" (codice BDNS A75A0.1) autorizzato ai sensi del D.Lgs 26/2014 con DM del Ministero della Salute n° 803/2018-PR del 15/10/2018, vista l'autorizzazione nella quale si prescrive "l'invio all'Ufficio 6 della DGSAF dei dati relativi alle condizioni di stress rilevate durante le singole fasi del progetto, nonché le misure intraprese per limitare gli effetti avversi, con cadenza semestrale", si comunica quanto segue:

- 1) Si richiamano integralmente le condizioni di stabulazione, modalità e tipologia di accesso agli arricchimenti ambientali, cognitivi e alimentari riportati nelle relazioni precedenti. In particolare, si richiamano e si confermano valide e attuali le considerazioni riportate nella relazione del 6 Marzo 2020, rispetto alle condizioni di stabulazione, modalità e condizioni di accesso agli arricchimenti ambientali e cognitivi (punto 2), equilibrio psico-fisico individuale e di coppia, assenza di segni di stress e stereotipie (punto 3), regime alimentare con accesso a cibo e acqua secondo il loro fabbisogno quotidiano individuale (punto 4), procedure di training esclusivamente basate sul rinforzo positivo e assenza di regimi di deprivazione o riduzione dell'apporto di nutrienti rispetto al fabbisogno giornaliero degli animali (punto 5).
- 2) Riguardo le valutazioni su possibili segni di stress e sofferenza, si ricorda che tali valutazioni vengono effettuate sulla base di categorie e parametri costantemente monitorati dal personale coinvolto nel progetto, così come dettagliati nella "scheda di valutazione clinica dei segni di possibile sofferenza" inclusa al punto 24 del progetto autorizzato.
- 3) Le condizioni di stabulazione e stress degli animali, e le procedure di training sono state valutate in modo indipendente dal dott. _____, primatologo dell'Istituto Superiore di Sanità, nel ruolo di *Ethics Advisor* individuato per le valutazioni *in itinere* richieste dallo *European Research Council* sul progetto. Il report del _____ allegato alla presente relazione, è stato redatto nel Marzo 2020 a seguito della valutazione effettuata presso gli stabulari dell'Università di Parma il 27 Febbraio 2020.



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA E CHIRURGIA

Via Gramsci, 14 - 43126 Parma

Tel: +39 0521 033184 fax: +39 0521 033185

e-mail: amministrazione.dimec@unipr.it - PEC: DipMedicina@pec.unipr.it

- 4) Le procedure sperimentali, sospese per effetto dell'ordinanza cautelare n. 230/2020 del Consiglio di Stato del 23 Gennaio 2020, sono riprese regolarmente il 2 Giugno 2020, a seguito della sentenza n. 05771/2020 del TAR Lazio, pubblicata il 01 giugno 2020. Durante l'intero periodo di sospensione delle attività sperimentali sono state mantenute invariate le condizioni di stabulazione, l'accesso degli animali ad arricchimenti ambientali e cognitivi, le dosi ottimali di cibo e acqua in base al fabbisogno individuale, nonché il monitoraggio quotidiano delle loro condizioni psico-fisiche, che non hanno evidenziato alcuna variazione degna di nota. Inoltre, le suddette condizioni sono state garantite anche durante le limitazioni imposte per contrastare la pandemia da COVID-19. Infatti, in base alla normativa in vigore rispetto alla attività indifferibili, tecnici stabularisti (quotidianamente) e personale di ricerca e veterinario (all'occorrenza), hanno continuato a frequentare i locali dello stabulario garantendo la pulizia delle gabbie, l'accesso degli animali a frutta secca, fresca e ortaggi e agli arricchimenti ambientali e cognitivi in base al programma di rotazione prestabilito, nonché il monitoraggio quotidiano delle condizioni psicofisiche degli animali.
- 5) Il 2 giugno 2020 è stata gradualmente ripresa l'interazione e abituazione tra animali e sperimentatori. Dopo una iniziale fase di monitoraggio, che non ha rilevato alcun segno di stress o disagio, il 4 giugno sono riprese le procedure di auto-addestramento, come da protocollo sperimentale. Nonostante la lunga sospensione dell'attività, gli animali hanno risposto in maniera collaborativa e confidente.
- 6) In accordo con il cronoprogramma previsto dal protocollo sperimentale autorizzato, si è proceduto al posizionamento dei punti di reperi anatomici (in materiale ceramico biocompatibile), preliminare alla risonanza magnetica e alle successive fasi di sperimentazione. Il posizionamento è avvenuto il 28 luglio 2020, previa comunicazione all'ufficio 6 della DGSAF il 13 luglio 2020. L'operazione, minimamente invasiva e di breve durata, è stata effettuata in condizioni di asepsi e in anestesia generale, alla presenza del veterinario designato e del veterinario anestesista, e non ha presentato alcuna complicazione. Il monitoraggio post-chirurgico degli animali non ha evidenziato alcun segno di disagio, dolore o stress e gli animali hanno potuto tornare ad alimentarsi e a svolgere, in coppia, le normali attività quotidiane già nelle ore immediatamente successive.
- 7) Nello stesso contesto, si è provveduto a misurare il peso dei due esemplari. Il peso rilevato in data 28 Luglio 2020 è 12.5 kg (Larry - ID 140403599- soggetto dominante) e 11.4 kg (Alan - ID:1402269 -soggetto subordinato). Il confronto con i valori ponderali rilevati il 4 marzo 2020 (e riportati nella seconda relazione semestrale del 6 marzo 2020), indicano un ulteriore incremento di 1,3 kg (Larry) e 0,95 kg (Alan), a conferma delle condizioni psicofisiche ottimali di entrambi gli animali e dell'adeguato apporto di cibi o liquidi.
- 8) In data 1° agosto 2020, gli animali sono stati trasportati presso la Fondazione IMAGO 7 di Pisa (c/o IRCCS Stella Maris), sede autorizzata per l'acquisizione non invasiva di immagini anatomiche strutturali del cervello in risonanza magnetica, secondo quanto previsto dal



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA E CHIRURGIA

Via Gramsci, 14 - 43126 Parma

Tel: +39 0521 033184 fax: +39 0521 033185

e-mail: amministrazione.dimec@unipr.it - PEC: DipMedicina@pec.unipr.it

progetto autorizzato. Le scansioni consentiranno la ricostruzione anatomica del cervello dei primati ed anche la realizzazione di presidi di fissaggio adattati specificatamente all'anatomia del cranio di ciascun esemplare; una misura di *refinement* che consente di ottimizzare la biocompatibilità dei presidi, ridurre i tempi di impianto e l'invasività delle procedure. Il rientro presso gli stabulari dell'Università di Parma è avvenuto nella stessa giornata. Al rientro, gli animali non hanno mostrato alcun segno di aggressività o frustrazione, e nessun comportamento stereotipato che potesse suggerire uno stato di malessere. Hanno avuto accesso alla sezione "gabbia ricreazione" con arricchimenti ambientali aggiuntivi, oltre a pellet, frutta fresca e acqua, nel corso del fine settimana, per poi riprendere normalmente le procedure di addestramento la settimana successiva.

- 9) Durante il mese di agosto, sono proseguite le procedure di addestramento alla salita in sedia con le metodologie autorizzate, basate esclusivamente sul rinforzo positivo. L'addestramento è propedeutico al trasferimento degli animali in laboratorio per l'apprendimento dei compiti sperimentali di detezione e riconoscimento di stimoli visivi previsti per le fasi successive degli esperimenti.
- 10) Le condizioni psico-fisiche generali rimangono costantemente monitorate, sono ad oggi ottimali, e non si rilevano segni di stress o compromissione del consueto stato di benessere degli animali

Il responsabile scientifico del progetto

Il responsabile dell'esecuzione
degli esperimenti

Il veterinario designato

Il responsabile del
benessere animale

ERC CONSOLIDATION GRANT 2017

“Turning the cortically blind brain to see: from neural computations to system dynamics generating visual awareness in humans and monkeys” – “LIGHT-UP”

External Ethical Evaluation

To the aim of preparing this Report, I visited the animal facilities at the University of Parma, where the experiments will be conducted met the experimental monkeys, and conducted face-to-face interviews with the team: from the monkey-keepers to *in situ* and via skype.

This is the first ethical evaluation for the project “LIGHT-UP”, which implies experimental procedures on non-human primates (NHP) (Rhesus macaque, *Macaca mulatta*). This report covers the first 18 months of the project. Two female animals were initially recruited, but then never actually enrolled in any procedure foreseen in the project because of idiopathic diarrhea reported since their arrival at the University of Parma. In agreement with the Italian Ministry of Health these two animals have been returned to the authorized provider and two other animals have been enrolled on 8th August 2019. During the first part of the project, two experimental subjects (two male young adults) have been subjected to a positive training procedure, to habituate them to sit on a chair, which will be used in the following part of the project to collect neurological data.

The present project is significantly in line with Article 4 (“Principle of replacement, reduction and refinement”) of the Directive 2010/63/EU on the protection of animals used in scientific procedures, and consequently with the related Article 13 of the D. Leg.vo 26/2014 (Italian implementation of the Directive 2010/63/EU).

In particular:

Replacement: The Rhesus macaque is an appropriate species, and provides reliable animal model, suited to the aims of the project. The complexity of behaviours to be studied in this project does not allow the use of different species, other than a NHP. The macaques present functional, anatomical, cognitive and behavioural analogies with the human species. In particular, the optical pathways of this non-human primate are very similar in function and anatomical structure with those of the human species. Furthermore, the Rhesus macaque is traditionally used in neuroscience studies, because it shows a high adaptability to captive conditions. In the past years it has also shown to be a very good subject for positive training programs in different EU primate laboratories.

Reduction: The number of subjects utilized in the present project at the present moment is two. I consider this to be the minimal number necessary to obtain potentially significant results, convincing replication of such results and a good level of reproducibility.

Refinement-Housing conditions: I visited the laboratory where the experimental animals are housed. The experimental subjects (N=2) are housed in pair. They are in view of other macaques housed in the same facility. As a behavioural primatologist, I was able to observe their behavior looking for signs of stress or behavioural abnormalities. I could not detect any stereotypy, any social behavioural abnormality, physical or behavioural signs of stress or discomfort. Animals appeared vigilant, curious and active. The monkeys were showing a positive attitude towards the members of the team: not scared, confident and accepting food treats from their hands. The cages respect the size and measures of what required by law, and the animals have space to move around and stretch their limbs. I have been shown an impressive plan or rotation for the environmental enrichments. The enrichments are divided in structural, sensorial and cognitive (puzzle feeders). The schedule for rotation for the mobile enrichments includes a description of their possible use. The animal-keeper in charge of the enrichment plan is very creative, experienced and motivated.

I was informed that there are plans to enlarge the space available for the monkeys in the animal house.

Refinement-Experimental procedures:

I have not witnessed a training session of the two subjects, as a consequence of the “ordinanza del Consiglio di Stato”, which suspend experimental procedures until 21 April 2020. However, the training session has been described to me in great details, from which I could with no doubt sense the professionalism and skill of the researcher in charge of this procedure. In particular, I have been told that the chair used in this case is completed by a mechanism (a sort of keyboard) which allows the monkey to directly decide and control the timing of the different steps of the training session. Control of the environment is one of the key factors to assure an acceptable level of welfare for captive animals.

Several team members of the “Light-Up” project is involved in another project in which this same elements of the training are also essential parts. Therefore the procedures are essentially the same. In this case I was able to witness a session of training to sit in the chair, and being transferred from the home cage to the experimental room. I was very impressed by the procedures and attitudes applied during the training sessions. The team applies a system in which the animal is always in control of what happens during the training session. All of the procedures is conducted silently with a great attention to any possible sign of stress by the experimental subject. The use of collars is excluded, except when it shows to be less stressful than using another methodology. In any case, a rigid collar is never used, and animals are never forced to do something they do not want to do. Each step of the training procedure is rewarded with a particular treat. Fruit and vegetables are normally not given to the subjects during training days, but used to reward desired behavioral, in addition to standard intake based on regular pellets and water *ad libitum*. Therefore, no food deprivation occurs during the training sessions.. When the training session are interrupted, the usual feeding schedule resumes. Another important aspect is that each experimental subject interacts nearly always with just one student/researcher, in order to develop a sense of trust between that particular human and the monkey. The sense of trust and absolute lack of fear/stress in the trained animal is considered essential.

Another important factor is the importance the team gives to the social hierarchy which characterizes the relationship between the two males. The order of training for the pair respects the dominant-subordinate relationship, as well as the attention given to the two subjects by the animal keeper.

In terms of procedures related to the use of anesthetics, when necessary, the animal are pushed against the end of the cage with the traditional method of sliding cages. Then, when the animal is immobilised, the arm is gently grabbed for the injection. I asked whether would be possible to use a training procedure also in this case. The answer was that it would be too much of a time-consuming effort, for a procedure that is rarely performed.

In general, I consider that the concept of "Refinement" is very well understood and implemented for what concerns the procedures described above.

INTERVIEWS WITH THE TEAM

I conducted extensive interviews with the members of the "LIGHT-UP" team. In my opinion it is extremely important to get the feeling of the attitudes and opinions of the people involved in the project at different levels and with different responsibilities. All of this information is composing a scenario in which ethical issues related to the project can be generally evaluated.

I was positively impressed by all the people I met: from the researcher himself and the researcher via skype, to the animal keeper taking care of the cleaning and feeding of the monkeys. I found a significant overlapping of motivations, opinions and concerns, resulting in a very compact team, devoted both the welfare of the monkeys and to the quality of the science produced, with different emphasis depending on the person's role in the team. However, for all of them, welfare of the animals and quality of the data go hand-in-hand.

I summarized below the main points expressed by the members of the team:

- The personnel underline the importance of a personal relationship with the monkeys. The macaques must be able to trust the humans, and the animals are able to distinguish one person from another. It is important that the monkeys are calm and trusting. I have been told about the importance of a "feeling" between the monkeys and the humans in the lab.
- In terms of enrichment, I have been told that each animal has its own preferences, especially in the case of food enrichments. The animal keeper demonstrated a great care in details and a knowledge of the experimental subjects as individuals.
- Several of the people involved with the projects, animal-keeper as well as young researchers, spoke about a sort of "emotional barrier" between them and the experimental subjects who are going to go experience the lesion of the visual system through surgical procedure. But this does not exclude the care and attention to their needs.
- The knowledge of the monkey species' ethology is crucial to understand when they are comfortable or not. It is very important in order to conduct a successful training session.
- It is considered to be important for the animals to have a certain control on the procedures, and the training procedures are tuned to individuals' character and attitude.
- The procedures *per se*, if the animal can exercise a certain degree of control, becomes a sort of enrichments for the life of the subjects, beside the time spent in their home-cage. As a matter of fact, the experimental subjects actively show signs of interest in participating in

the training sessions. The control on the procedures is related to the routine in which the procedures are carried out.

- The personnel not expert in animal welfare and ethology was sent to follow a course on these topics at the DPZ in Gottingen.
- Nearly everybody pointed out that each monkey has its own personality, and all of the monkeys have names.
- There is a good level of communication and understanding between animal-keepers, veterinary personnel and researchers, in relation to the level of welfare of the monkeys. The animal keepers know about the project.

COST-BENEFIT ANALYSIS

The refinement techniques adopted, as described above, result in a harm imposed to the animals which is barely detectable in view of the very significant progress in understanding the conditions in which a significant pathology in humans, connected to the visual nervous pathways, can be better described and possible cures can be proposed.

GENERAL COMMENTS AND RECOMMENDATIONS

The procedures utilised during the first 18 months of the present project meet a satisfying ethical standard. This is also in relation to the high scientific value of the research in improving our knowledge of, and possibly to cure, an important pathology which affectst the visual capabilities of our species.

The NHP subjects are utilized with respect of their welfare needs. No obvious level of pain is left unattended or minimized. The entire team is really focused on maintaining and increasing the already high standard of welfare of the animals involved, as well as the quality of the scientific work.

The recommendations I could make is to continue to keep the “3Rs Principle” as the mind-frame accompanying and guiding every step of the present project in its future development. In particular, I would suggest to consider for the future the possibility to train the macaques to offer their arms, through a procedure of positive training, when anesthetics have to be used.

Finally, I consider the ethical standard maintained in the project “LIGHT-UP” to be very impressive, and inspirational for other projects, especially for those utilizing non-human primates in neuroscientific research.