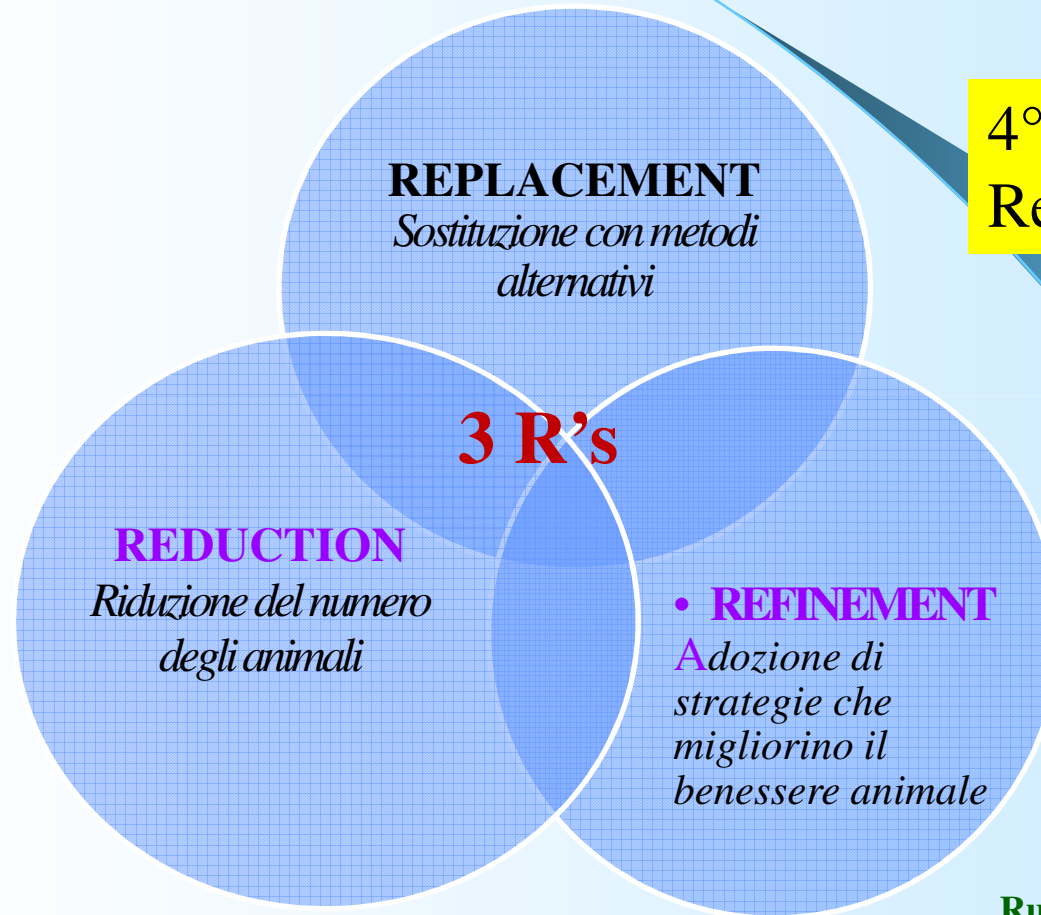


Strategie di mantenimento di colonie di piccoli roditori da laboratorio

PRINCIPIO DELLE 3R



4°R:
Responsability

Russel e Burch (1959)
D.Lvo 116/92

ASPETTI RIPRODUTTIVI



Pubertà	5 settimane	6-8 settimane	
Età riproduttiva	5-8 settimane	12-16 settimane	
Ciclo estrale	4 giorni	4-5 giorni	
Durata estro	14 ore	14 ore	
Durata gravidanza	19 giorni (18-21)	21-23 giorni	
Numero nati/cucciolata	2-12	6-12	
Peso alla nascita	0,5-1,5 grammi	5 grammi	
Peso allo svezzamento	10 grammi	40-50 grammi	
Età svezzamento	21 18 giorni	21 giorni	

Strain	Rotation Length† (wks)	Mean litter size (weaned)	Mean number of litters (born)	Wean:born ratio
BALB/cJ (000651)	30	5.4	4.1	0.99
BALB/cByJ (001026)	30	5.2	3.8	0.96
B6.129P2-Apoe ^{tm1Unc} /J (002052)	26	4.5	3.9	0.83
C3H/HeJ (000659)	22	5.0	3.5	0.92
C57BL/6J (000664)	30	5.6	5.4	0.92
CBA/J (000656)	26	4.0	5.4	0.93
DBA/2J (000671)	26	4.7	5.3	0.93
FVB/NJ (001800)	26	7.3	4.9	0.98
NOD/ShiLtJ (001976)	22	7.7	3.5	0.92
NOD.CB17-Prkdc ^{acid} /J (001303)	26	5.8	4.1	0.94
NOD.Cg-Prkdc ^{acid} Il2rg ^{tm1Wjl} /SzJ (005557)	30	6.4	3.6	0.97
129S1/SvImJ (002448)	30	4.9	4.6	0.89

BREEDING PERFORMANCE GENOTIPO

- ✓ Variabilità della vita riproduttiva : da 5 a 8 mesi.
 - Ridotta nei C3H per alta incidenza di cisti ovarica
- ✓ Variabilità nella numerosità delle nidiate

Fonte: Jackson Lab 2005-2007



C57BL/6JRj Mouse

- **Strain name:** C57BL/6JRj
- **Type:** Inbred mouse
- **Origin:** CSAL (Orleans) - 1993 (F172)
- **Colour and related genotype:** Black mouse, *a (a/a)* non agouti - MHC: Haplotype *H2^b*
- **Breeding:** Good breeder but quite difficult to rear (sensitive to the environment). Cannibalism with its pups.

This strain was created by C.C. LITTLE, in 1921, from Miss Abbie LATHROP's stock. The Jackson Laboratory's colony was divided in two sub-strains before 1937, resulting in the C57BL/6 and the C57BL/10 strains. The C57BL/6 strain was brought to The Jackson Laboratory in 1948 (C57BL/6J).

It's a widely used strain and was the first one to have its genome sequenced. It's not very sensitive to spontaneous tumours but allows for the expression of a wide variety of mutations, hence its frequent use as genetic background in transgenic models.

C57BL/6JRj show age-related hearing loss and are resistant to audiogenic seizures. It is sensitive to Diet-Induced Type II diabetes and atherosclerosis. **C57BL/6JRj** can show alopecia of uncertain etiology: it could have behavioural causes – overgrooming/barbering (JAX® Notes, 1987, Sundberg *et al.*, 2011) – or behaviour similar to human compulsive hair pulling (Garner *et al.*, 2004).

Main application and research fields

- Cardiovascular research: atherosclerosis
- Development biology, ageing
- Immunology and inflammation
- Infections
- Metabolism: obesity, diabetes, hyperglycemia, insulin resistance
- Neurobiology and neuro-sensorial research
- Oncology
- Genetic background for transgenic animals production
- Toxicology, hematology



C57BL Hairloss associato all'overgrooming

VALUTAZIONE CLINICA

❖ "BARBERING" assenza PELO/VIBRISSE



Arricchimenti ambientali

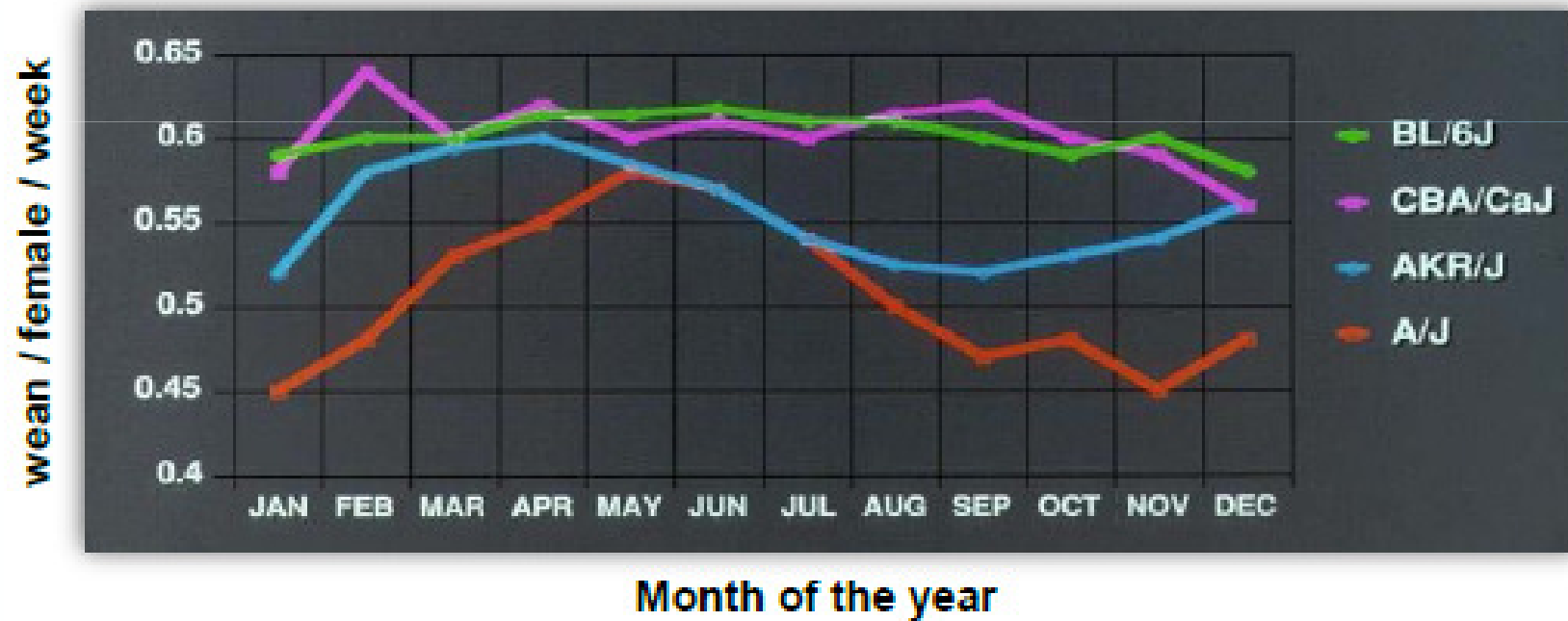


BREEDING PERFORMANCE

FATTORI AMBIENTALI

- T ottimale tra 18-24°C
- Umidità ottimale: 40-60%
- Ciclo luce/buio: 12h/12h
- Rumori, vibrazioni (cannibalismo)
- Odori
- Dieta (12%fat o 5%fat)
- Stato di salute (Sendai Virus, Endoparassiti)
- Stagioni

Variazioni stagionali



BREEDING PERFORMANCE

- Accoppiare **animali giovani** (dalle 6-8 settimane)
- Animali accoppiati dopo i 4 mesi di età difficilmente saranno buoni riproduttori
- Sostituire i riproduttori quando si avvicinano al termine della vita riproduttiva. Mantenere una colonia “mista” di riproduttori di età diverse migliora i risultati
- Utilizzare maschi più vecchi e di accertata fertilità migliora i risultati
- Sostituire le coppie non produttive dopo 2-3 mesi di accoppiamento senza produzione di nidiate o se 2-3 nidiate consecutive non vengono portate allo svezzamento

Per Ottimizzare gli accoppiamenti

- Le femmine sono ricettive nella fase di **estro**
- Durata dell'estro: 4-6 gg : circa 1/5 femmine è in estro (random)
- Femmine mantenute in gruppo possono sincronizzare l'estro (Effetto Lee-Boot) ma l'assenza prolungata di ferormoni maschili può portare alla scomparsa del ciclo estrale.
- L'estro è fortemente legato al fotoperiodo luce/buio solitamente mantenuto a 12/12. Gli accoppiamenti avvengono circa a metà del ciclo buio
- Nelle 24 ore successive al parto, si ha un estro post-partum

Effetto Whitten (induzione dell'estro)

- Femmine giovani stabulate insieme
- Aggiungere un po' di segatura proveniente da una gabbia di un maschio sessualmente maturo
- Dopo 3 giorni (durata estro 4-5 giorni; ovulazione 3° giorno) spostare la femmina nella gabbia di un maschio.
- Per migliorare i risultati, stabulare il maschio in gabbia singola qualche giorno prima per consentirgli di stabilire una territorialità

Estrus Detection



Estrus

Apertura vaginale appare gonfia umida e la mucosa ha un colore roseo.

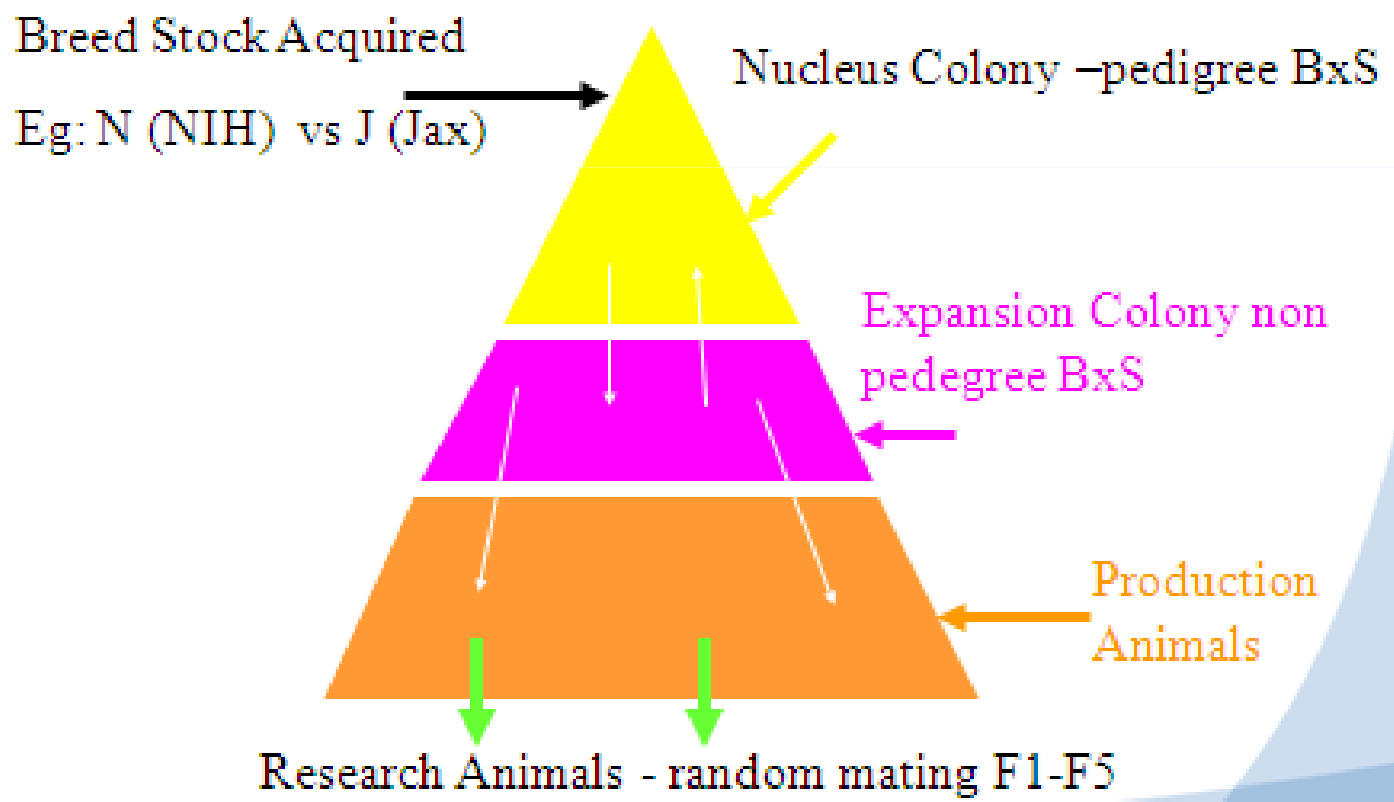
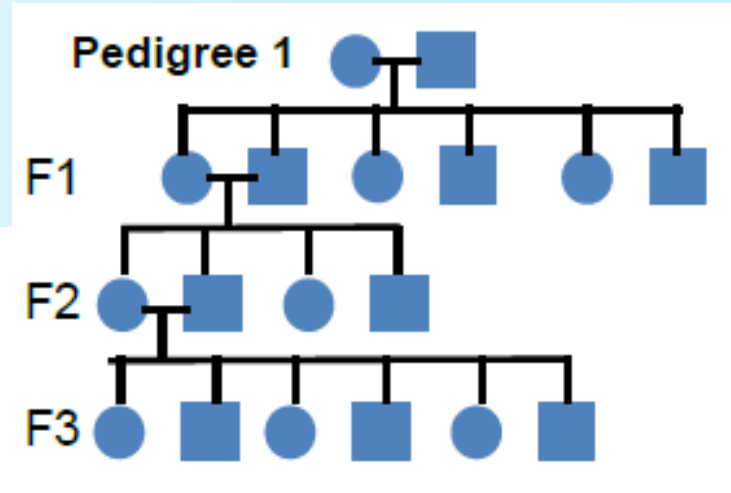
Non-Estrus

Handling: sostenere l'animale dalla coda facendolo aggrappare ad una griglia con le zampe anteriori. Premere delicatamente la zona dorso-sacrale

Tipi di accoppiamento

- Monogamia: 1 maschio + 1 femmina
(estro post-partum; minor numero di nidiate)
- Trio: 1 maschio + 2 femmine
- Harem: 1 maschio + 3-5 femmine
 - Femmine allontanate prima del parto (perdita estro post partum);
 - richiesti pochi maschi
 - Controlli frequenti (evitare il sovrappollamento)

INBRED PRODUCTION



Quanti animali occorrono?

Example:

How many breeding females are needed to produce 10 female & 10 male homozygotes per week using a homozygous female x homozygous male breeding scheme?

Strain characteristics

Breeding scheme	Homozygotes x Homozygote
Breeding lifespan	32 weeks
Number of litters produced	4 litters
Litter frequency	1 litter/8 weeks (4 litters/32 weeks)
Litter size	6 pups (3 females, 3 males)
Offspring genotypes	Homozygotes only
Percent useful offspring	100%

Number of experimental mice needed

1. Number of mice needed	20
2. Age requirements If must be same age, enter 1 If can have a two-week age range (e.g., five to six weeks old), enter 2 If can have a four-week age range (e.g., five to eight weeks old), enter 4	1
3. Frequency with which mice are needed If weekly, enter 1 If every other week, enter 2 If once a month, enter 4	1
4. Divide Line 1 by the smaller of Line 2 or Line 3 (round up to nearest whole number)	20
5. Sexes needed If both sexes needed, enter 1 If one sex needed, enter 2	1
6. Breeding scheme If homozygote x homozygote, enter 1 If heterozygote x homozygote, enter 2 If heterozygote x heterozygote, enter 4	1
7. Some surplus (insurance) mice desired If no, enter 1 If yes, enter a "fudge factor" to ensure overproduction e.g., if 10% more mice are desired, enter 1.1)	1.1
8. Number of mice to be produced weekly Multiply Lines 4 x 5 x 6 x 7 (round up to nearest whole number)	22

8. Number of mice to be produced weekly Multiply Lines 4 x 5 x 6 x 7 (round up to nearest whole number)	22
---	----

Colony productivity

9. Average number of pups weaned per litter	6
10. Average number of litters produced per breeder female	4
11. Average productive female's breeding lifespan (weeks)	32
12. Calculate colony productivity (number of weaned pups/female/week) Divide Line 10 by Line 11, multiply by Line 9 (round to nearest hundredth)	0.75
13. Calculate number of breeding females needed Divide Line 8 by Line 12 (round up to nearest whole number)	30

Number of breeding females needed to keep colony productive

14. Calculate number of replacement breeders needed per week Divide Line 13 by Line 11 (round up to nearest whole number)	1
15. Calculate the number of additional breeders needed to provide replacement breeders Divide Line 14 by (2 x Line 12), then multiply by Line 5 (round up to nearest whole number)	1

Total number of breeders needed

16. Add Line 13 and Line 15	31
-----------------------------	----

Number of cages needed per week

17. Breeding cages For pair breeding (one breeding female per cage): 31 cages needed (16 boxes) or trio breeding (two breeding females per cage): 16 cages needed (8 boxes)	
18. Weaning cages ~11 females & ~11 males weaned per week will require ~ 6 cages (5 animals per cage separated by sex), ~ 3 boxes	

Example A1:

How many breeding females are needed to produce 10 female & 10 male homozygotes per week using a heterozygous female x heterozygous male breeding scheme?

Strain characteristics

Breeding scheme	Heterozygotes x Heterozygote
Breeding lifespan	32 weeks
Number of litters produced	4 litters
Litter frequency	1 litter/8 weeks (4 litters/32 weeks)
Litter size	6 pups (3 females, 3 males)
Offspring genotypes	25% Homozygotes, 50% Heterozygotes, 25% Wild-type
Percent experimental pups	25% Homozygotes females and males

Example A2:

How many breeding females are needed to produce 20 male homozygotes per week using a heterozygous female x heterozygous male breeding scheme?

Strain characteristics

Breeding scheme	Heterozygotes x Heterozygote
Breeding lifespan	32 weeks
Number of litters produced	4 litters
Litter frequency	1 litter/8 weeks (4 litters/32 weeks)
Litter size	6 pups (3 females, 3 males)
Offspring genotypes	25% Homozygotes, 50% Heterozygotes, 25% Wild-type
Percent experimental pups	25% Homozygotes x 0.5 males = 12.5%

Example A3:

How many breeding females are needed to produce 40 female homozygotes (2 week age range) every two weeks using a homozygous female x homozygous male breeding scheme?

Strain characteristics

Breeding scheme	Homozygotes x Homozygote
Breeding lifespan	32 weeks
Number of litters produced	4 litters
Litter frequency	1 litter/8 weeks (4 litters/32 weeks)
Litter size	6 pups (3 females, 3 males)
Offspring genotypes	100% Homozygotes
Percent experimental pups	100% x 0.5 females = 50%

SERIE GENERALE

Spediz. abb. post. - art. 1, comma 1
Legge 27-02-2004, n. 46 - Filiale di Roma

Anno 155° - Numero 61

GAZZETTA UFFICIALE
DELLA REPUBBLICA ITALIANA

PARTE PRIMA

Roma - Venerdì, 14 marzo 2014

SI PUBBLICA TUTTI I
GIORNI NON FESTIVI

DIREZIONE E REDAZIONE PRESSO IL MINISTERO DELLA GIUSTIZIA - UFFICIO PUBBLICAZIONE LEGGI E DECRETI - VIA ARENULA, 78 - 00186 ROMA
AMMINISTRAZIONE PRESSO L'ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO - VIA SALARIA, 1027 - 00186 ROMA - CENTRALINO 06-85081 - LIBRERIA DELLO STATO
PIAZZA S. VERDI, 1 - 00186 ROMA

La Gazzetta Ufficiale, Parte Prima, oltre alla Serie Generale, pubblica cinque Serie speciali, ciascuna contraddistinta da autonoma numerazione:

- 1ª Serie speciale: Corte costituzionale (pubblicata il mercoledì)
- 2ª Serie speciale: Comunità europea (pubblicata il lunedì e il giovedì)
- 3ª Serie speciale: Regioni (pubblicata il sabato)
- 4ª Serie speciale: Concorsi ed esami (pubblicata il martedì e il venerdì)
- 5ª Serie speciale: Contratti pubblici (pubblicata il lunedì, il mercoledì e il venerdì)

La Gazzetta Ufficiale, Parte Seconda, "Foglio delle inserzioni", è pubblicata il martedì, il giovedì e il sabato

AVVISO ALLE AMMINISTRAZIONI

Al fine di ottimizzare la procedura di pubblicazione degli atti in Gazzetta Ufficiale, le Amministrazioni sono pregate di inviare, contemporaneamente e parallelamente alla trasmissione su carta, come da norma, anche copia telematica dei medesimi (in formato word) al seguente indirizzo di posta elettronica certificata: gazzettaufficiale@giustiziacert.it, curando che, nella nota cartacea di trasmissione, siano chiaramente riportati gli estremi dell'invio telematico (mittente, oggetto e data).

Nel caso non si disponga ancora di PEC, e fino all'adozione della stessa, sarà possibile trasmettere gli atti a: gazzettaufficiale@giustizia.it

SOMMARIO

LEGGI ED ALTRI ATTI NORMATIVI	DECRETI, DELIBERE E ORDINANZE MINISTERIALI
<p><u>DECRETO-LEGGE 14 marzo 2014, n. 25.</u> Misure urgenti per l'avvalimento dei soggetti terzi per l'esercizio dell'attività di vigilanza della Banca d'Italia. (14G00040)..... Pag. 1</p> <p><u>DECRETO LEGISLATIVO 4 marzo 2014, n. 26.</u> Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. (14G00036)..... Pag. 2</p>	<p>Ministero dell'economia e delle finanze</p> <p>DECRETO 7 marzo 2014. Accertamento del tasso d'interesse semestrale dei certificati di credito del tesoro 1° settembre 2008-2015 e 1° marzo 2010/2017, relativamente alle cedole con decorrenza 1° marzo 2014 e scadenza 1° settembre 2014. (14A02121)..... Pag. 69</p>

Decreto Legislativo
n. 26 del 4 Marzo 2014

Nuovo **Allegato VI**: presentazione di un progetto di ricerca

- Indicare i criteri di selezione del campione e la suddivisione in gruppi
- Considerazioni statistiche (come è stato determinato il numero di animali)
- Utilizzo di animali Tg
- Genotipizzazione degli animali GM (procedura)
-

Produzione dell' **Allegato IX**: Sintesi non tecnica max 500 parole (parole chiave, finalità, contributo al progresso scientifico, effetti avversi , descrizione dell'applicazione delle 3R). Verrà pubblicato dal Ministero entro 3 mesi dal rilascio dell'autorizzazione

Art. 31: necessità di autorizzazione del Ministero per tutti i progetti di ricerca
Durata 5 anni

Valutazione retrospettiva effettuata dal Ministero quando previsto nell'autorizzazione (valuta il raggiungimento dei risultati, numero animali ecc.

Tabella 1.1. Topi

	Peso corporeo (g)	Dimensione minima dell'alloggiamento (cm ²)	Spazio al suolo per animale (cm ²)	Altezza minima dell'alloggiamento (cm)	Data di cui all'articolo 22, comma 1
In riserva e durante le procedure	fino a 20	330	60	12	1° gennaio 2017
	> 20 fino a 25	330	70	12	
	> 25 fino a 30	330	80	12	
	oltre 30	330	100	12	
Riproduzione		330 Per una coppia monogama (non consanguinei/consanguinei) o un trio (consanguinei). Per ogni ulteriore femmina e figliata aggiungere 130 cm ²		12	

Tabella 1.2. Ratti

	Peso corporeo (g)	Dimensione minima dell'alloggiamento (cm ²)	Spazio al suolo per animale (cm ²)	Altezza minima dell'alloggiamento (cm)	Data di cui all'articolo 22, comma 1
In riserva e durante le procedure*	fino a 200	800	200	18	1° gennaio 2017
	> 200 fino a 300	800	250	18	
	> 300 fino a 400	800	350	18	
	> 400 fino a 600	800	450	18	
	oltre 600	1.500	600	18	
Riproduzione		800 Madre e figliata. Per ciascun animale adulto aggiunto all'alloggiamento in via permanente aggiungere 400 cm ²		18	

h minima gabbie per ratti da 14 a 18 cm

Superficie minima ratto 250 gr: Da 200 a 250 cm²

Requisiti per gli stabilimenti utilizzatori e di allevamento
D.Lvo n. 26 del 4 Marzo 2014

- Controllo degli **accessi**
- Programma di manutenzione **attrezzature**
- Locali idonei per le procedure e locali di servizio
- **Controlli giornalieri** e registrazioni
- Sistemi di **emergenza** per il mantenimento delle condizioni ambientali
- Impianti di riscaldamento e ventilazione dotati di dispositivi di **controllo e di allarme**
- **Controllo sanitario** periodico
- Programma di sorveglianza microbiologica e definizione dei parametri per l'introduzione di nuovi animali
- Arricchimenti ambientali

Gabbie in uso al BIOSTAB

Tipologia gabbia	Dimensioni (cm)	Superficie	D.Lvo 26 del 4.3.2014 1 topo 25-30 g: 80 cm ² 1 ratto 300-400 g: 350 cm ²	Disposizioni CSSI (cambio ogni 7-9 giorni)	Riproduzione
Rack Mice single cage	38 x 20 x 24	528 cm ²	7 topi	5 topi	1 coppia topi con nidiata: 330 cm ²
Rack Mice double cage	38 x 40 x 24	1118 cm ²	13 topi 3 ratti	10 topi 2 ratti	2 Femmine topi con nidiata (330 + 180 cm ²) 1 femmina ratto con nidiata
Opti Mice	34 x 29 x 15,5	484 cm ²	6 topi	4 topi	1 coppia con nidiata: 330 cm ²



Mice rack single cage



Mice rack double cage



Opti Mice

Gabbie in uso al Polistab

Tipologia gabbia	Dimensioni (mm)	Superficie	D.Lvo 26 del 2014 1 topo 25-30 g: 80 cm ² superficie 1 ratto 300-400 g: 350 cm ² superficie
GRANDE 1290D	425x 266x 155 h	820 cm ²	10 topi 2 ratti *
PICCOLA 1264 C	267x 207x 140 h	370 cm ²	5 topi



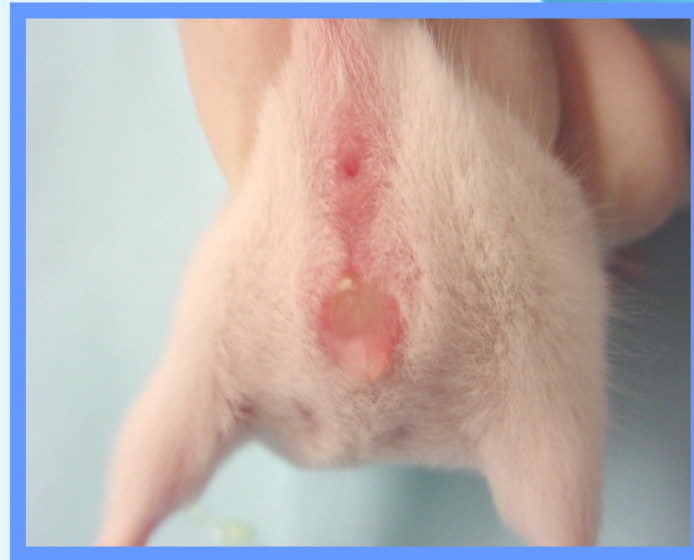
Dal 1 Gennaio 2017 l'altezza minima per le gabbie dei ratti è di **18 cm** per più del 50% della superficie minima

Checking for Plugs

Ad accoppiamento avvenuto è possibile individuare (prime ore del mattino) un “tappo” vaginale derivato da secrezioni prodotte dalle ghiandole prepuziali del maschio e depositate nell’apertura della vagina.

La presenza del plug non è indice di gravidanza accertata.

A volte può non essere visibile



Rodent Pup Sexing

- Sexing young rodents can be challenging – but with practice, pups as young as day 3 can be consistently identified.
 - Males have twice the anogenital distance that females have.
 - The nipple line in females is identifiable as early as day 8 or 9.
 - Once hair is present ~D9, the area between the testicles and anus is completely grown over with hair; in females the area is defined as a hairless line between the vaginal opening and anus.

Day 5



Male

Female

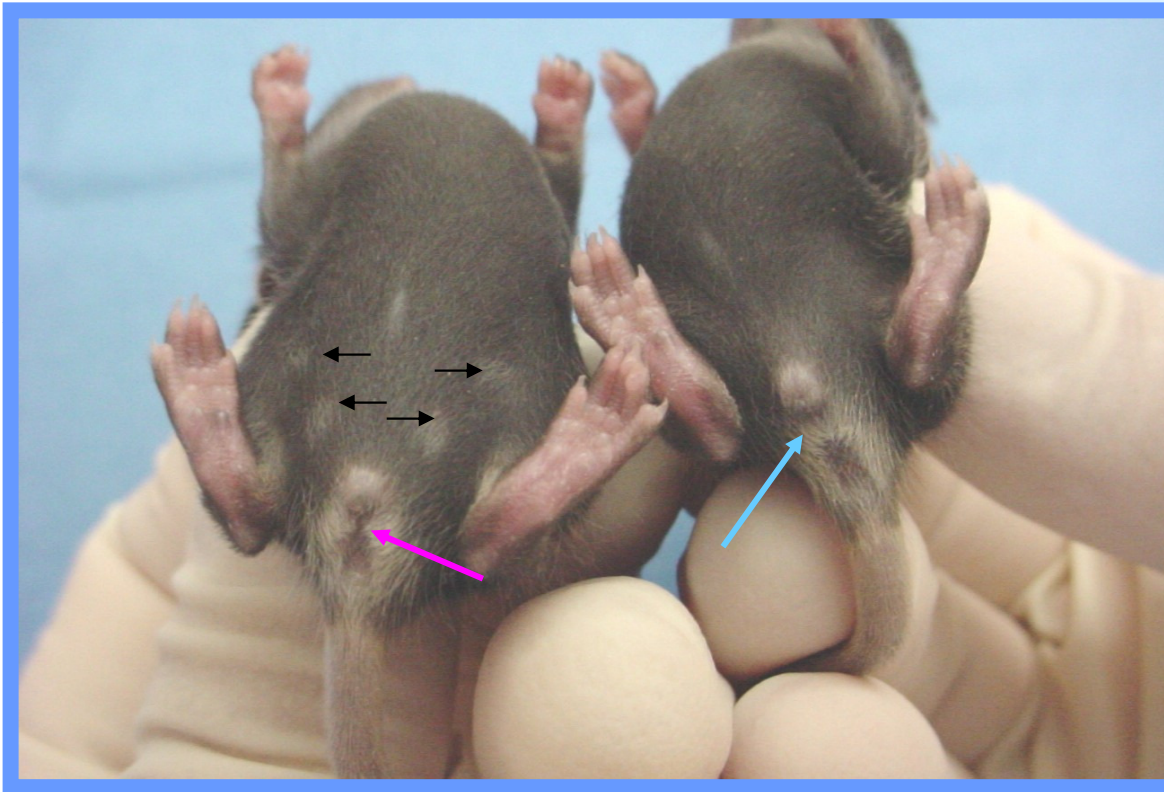
Day 7



Female

Male

Day 12



- Male-right – note the hair growth between the anus and prepuce
- Female-left – note the visible line between the vaginal opening and the anus, note the nipple line.

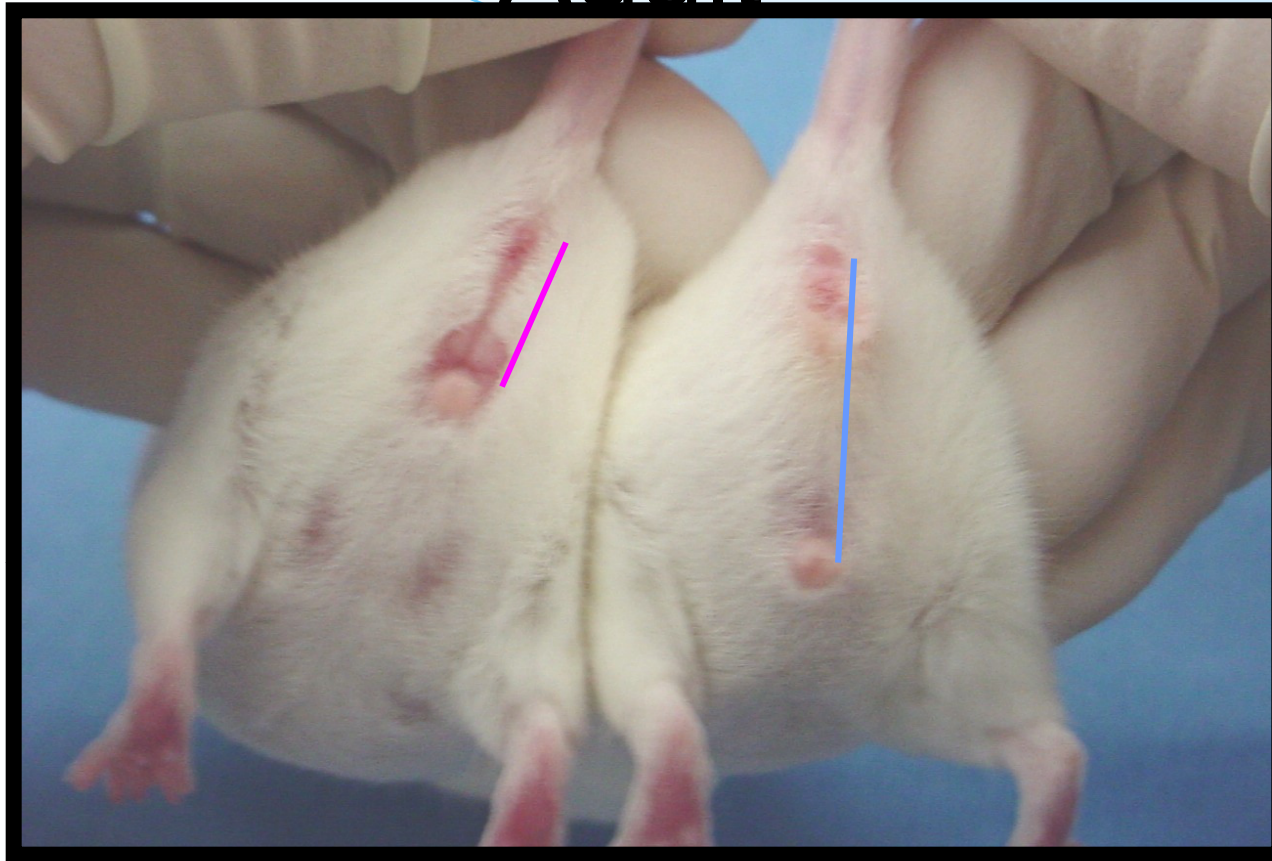
Day 21



Female-left

Male-right

Adult



Female

Note “line” between anogenital area is clearly visible; nipples are easily identified.

Male

Note anogenital area is completely fur covered.