

Merkblatt

zur Anzeige eines Verfahrens unter dem Rahmenantrag „ART-Verfahren als versuchstierkundl. Schlüsseltechnologien“

Allgemein:

- Die nachfolgend beschriebenen Verfahren **müssen** mit dem Formblatt „Anzeige eines Verfahrens unter dem Rahmenantrag „ART-Verfahren als versuchstierkundl. Schlüsseltechnologien“ an die RUF – Sachgebiet 54“ über den Projektleiter an die RUF zur Anzeige gebracht und bestätigt werden. Der Antrag ist zu stellen an: ZEMM_TT@ukw.de.
- Im Feld „Aktenzeichen des genehmigten Hauptantrags“ ist das Aktenzeichen für das Tierversuchsprojekt des Antragsstellers einzutragen.

- Die Unterbringung, Haltung und Zucht der neuen Linie, sowie Erfassung im FBI muss vorab mit dem Tierhaus ZEMM abgeklärt werden.
- Das Phänotypdatenblatt muss der Tierhausleitung vorliegen.
- Es gilt die Gebührenordnung des ZEMM (www.zemm.uni-wuerzburg.de). Die Abrechnungen erfolgen über die Verwaltungsleiterin Frau Hülya Noak.

- Der Auftraggeber überträgt die erforderlichen Tiere an die TT zur Durchführung der Sanierung. Er bevollmächtigt die TT, für diese Linie Arbeitsaufträge an die Tierhaltung zu erteilen.
Nach Abschluss des Verfahrens gehen die Tiere wieder an den Auftraggeber zurück. Die aus den Verfahren resultierenden Nachkommen gehen nach dem Absetzen an den Auftraggeber über, der für die Einhaltung des Tierschutzrechts verantwortlich ist.

- Eine erfolgreiche Durchführung der Verfahren kann grundsätzlich nicht garantiert werden.

Erläuterungen und Konditionen:

Hygienische Sanierung:

- Es werden **3-5** vitale Männchen (Mindestalter 7 Wochen) zur gezielten Verpaarung und 3-5 Weibchen zur Stimulationsverpaarung benötigt. **Nach Abschluss der Stimulationsverpaarung gehen die eventuell trächtigen Weibchen wieder an den Auftraggeber zurück.**
- Im Normalverfahren werden diese mit superovulierten wt-Spenderweibchen des angegebenen genetischen Hintergrundes verpaart, die Embryonen gewonnen und unter SPF-Bedingungen in Ammenmäuse transferiert (Embryotransfer).
- In begründeten Ausnahmefällen wird ein Intracross mit Weibchen des transgenen Stammes durchgeführt (z.B. Mehrfachmutante). Dies erfordert jedoch, dass uns Weibchen mit dem korrekten Genotyp im Alter von 28 Tagen für die Superovulation zur Verfügung stehen. Dies bedingt eine entsprechende Zucht in der Verantwortung des Auftraggebers, frühzeitige Genotypisierung, sowie eine gute zeitliche Koordination und Information der TT mit mindestens einer Woche Vorlauf, wenn die Weibchen 3 Wochen alt sind. Wir bitten um Kontaktaufnahme und Besprechung des Procedere.
- Nach dem Embryotransfer gelangen die Ammen in die Obhut der SPF-Tierhaltung. Dort werden die Nachkommen abgesetzt und Biopsieproben mit der Aufgabenstellung zur Genotypisierung an den Auftraggeber genommen. Es wird ein Hygienemonitoring durchgeführt. Die Sanierung ist abgeschlossen, wenn genügend Tiere für die Weiterzucht vorhanden sind und der Hygienebefund in Ordnung ist.

Rederivation kryokonservierter Embryonen:

- Es wird ein Auftauprotokoll benötigt, das an das Einfrierprotokoll angepasst ist und daher von dem Labor zur Verfügung gestellt wird, welches die Kryokonservierung durchgeführt hat.
- Die Embryonen sind in Eigenverantwortung zu importieren.
- Die Übergabe des sensiblen Materials an die TT muss im Vorfeld abgesprochen und zeitlich eng koordiniert werden. Die Embryonen werden bis zur Durchführung der Rederivation am ZEMM in LN2 zwischengelagert.
- Die rederivierten Embryonen werden unter SPF-Bedingungen in Ammenmäuse transferiert (Embryotransfer).

Rederivation kryokonservierter Spermien durch IVF:

- Als Auftau- und IVF-Protokoll wird Nakagata et al. verwendet (Nakagata N. Cryopreservation of mouse spermatozoa and in vitro fertilization. Methods Mol Biol;693:57-73. 2011). Falls der Versender ein anderes Protokoll vorschreibt oder empfiehlt, so ist uns dies zur Verfügung zu stellen.
- Für die IVF werden nach Möglichkeit superovulierte **wt**-Spenderweibchen des angegebenen genetischen Hintergrundes verwendet.
- Die Spermien sind in Eigenverantwortung zu importieren.
- Die Übergabe des sensiblen Materials an die TT muss im Vorfeld abgesprochen und zeitlich eng koordiniert werden. Die Spermien werden bis zur Durchführung der Rederivation am ZEMM in LN2 zwischengelagert.
- Grundsätzlich ist der Transport kryokonservierter Spermien auch auf Trockeneis möglich ist. Das Verfahren ist jedoch nicht hinreichend validiert und allgemein erprobt; das Risiko trägt der Auftraggeber.
- Die durch die IVF erhaltenen Embryonen werden unter SPF-Bedingungen in Ammenmäuse transferiert (Embryotransfer). Überschüssige Embryonen werden kryokonserviert.

Kryokonservierung von Zweizellembryonen über IVF:

- Die Kryokonservierung von Embryonen ist ein aufwendiges Verfahren mit einem hohen Tierverbrauch, das deshalb besonders wichtigen Linien vorbehalten ist und nur nach persönlicher Rücksprache durchgeführt wird. Standardverfahren ist die genehmigungsfreie Kryokonservierung von Spermien.
- Es werden 1 vitales Männchen (Mindestalter 7 Wochen) als Spermienspender und 1 Weibchen zur Stimulationsverpaarung benötigt. **Nach Abschluss der Stimulationsverpaarung geht das eventuell trüchtige Weibchen wieder an den Auftraggeber zurück.**
- Für die IVF werden nach Möglichkeit superovulierte **wt**-Spenderweibchen des angegebenen genetischen Hintergrundes verwendet. Bei genetisch komplexen Linien empfiehlt sich die Verwendung von Spenderweibchen des gleichen Stammes im Intracrossverfahren, die vom Auftraggeber zur Verfügung gestellt werden müssen (s. hygienische Sanierung).
- Es werden 2-Zell, ggf. 8-Zellembryonen kryokonserviert in einem 2-Schrittverfahren mit kontrollierter Kühlungsrate nach einem modifizierten Protokoll von Renard JP und Babinet C 1984.
- Für die Lagerung in LN2 entstehen Folgekosten. Die Lagerung erfolgt am ZEMM. Eine zweite, unabhängige Lagerstätte zur Risikoreduktion von Schäden und Unfällen besteht nicht. Es wird daher dringend empfohlen, einen Teil der Proben extern in eigener Verantwortung zu lagern.
- Im Falle einer zu erwartenden häufigen externen Nachfrage der Linie wird eine Archivierung in einem Mausrepositorium empfohlen (<https://www.infrafrontier.eu>).

Zitat aus der Genehmigung des Rahmenantrags:

13. Besondere Auflagen:

13.1 Die für die Eingriffe und Behandlungen dieses Rahmenantrags einzusetzenden Tierzahlen (Mäuse) sind pro neu zu sanierender, kryokonservierender, rederivierender Mauslinie bei der RUF vorab nachzubearbeiten.

Im Rahmen der Nachmeldung ist die Unerlässlichkeit antragsgemäß jeweils gesondert darzulegen.

Für die beantragten Verfahren können pro neuer Mauslinie/pro Verfahren folgende Tierzahlen jeweils nachbeantragt werden:

Art der Verwendung	Anzahl Spenderweibchen (Maus)	Anzahl Ammen (Maus)	
Hygienische Sanierung	6	4	
Rederivierung kryokonservierter Embryonen		3	
Rederivierung kryokonservierter Spermien	6	4	Reservetiere: Bei unzureichender Embryonenausbeute können Reservetiere nachbeantragt werden
Kryokonservierung von Embryonen	10		
IVF Kontrolle	2		
Monitoring Lagerbedingungen	12 pro Jahr		
Vasektomierte Männchen	Die Operation neuer vasektomierte Männchen ist ebenfalls unter Angabe der Anzahl vorab nachzubearbeiten (maximal 30 Tiere pro Jahr)		